

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel
Klinik für Neurologie, Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel
Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



FTDP-17-typische frontale Verhaltensänderungen bei R406W-Tau transgenen Mäusen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Marlen Lunow

aus Parchim

Marburg 2012

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am 28.06.2012.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. G. U. Höglinger

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Kruse

Meinen Eltern Waltraut und Rainer Plock

1	Einleitung.....	7
1.1	Frontotemporale Demenz	8
	Epidemiologie.....	8
	Einteilung und klinisches Bild.....	9
1.2	Frontotemporale Demenz mit Parkinson assoziiert mit Chromosom 17.....	13
	Tau-Protein und Neurodegeneration	14
	Mutationen im Tau-Gen	17
	Pathogenese und Neuropathologie	18
1.3	Übersicht der Tiermodelle der FTDP-17.....	23
	Mausmodelle hWT und RW	28
	Verhaltensäquivalente der Tau-Pathologie.....	30
1.4	Verhaltenstests.....	31
	Der Offenfeld-Test (OFT)	31
	Der Objektwiedererkennungstest (OWT)	31
	Der Soziale-Interaktions-Test (SIT)	32
	Der Rota-ROD-Test (Rota-ROD).....	32
	Der Forcierte-Schwimm-Test (FST)	33
1.5	Ziel der Arbeit	33
2	Material und Methoden	36
2.1	Körpergewicht	36
2.2	Transgene Mausmodelle.....	36
2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.4	Haltungsbedingungen	37
2.5	Übersicht über die Experimente	38
2.6	Generelle Versuchsdurchführung	40
2.7	Verhaltenstests.....	40
	OFT.....	40

OWT	41
SIT	43
Rota-ROD	43
FST	44
2.8 Vollautomatisierte Verhaltensanalyse	45
2.9 Statistik	46
3 Ergebnisse.....	48
3.1 Körpergewicht	48
3.2 Rota-ROD	49
Anzahl der Versuche	49
Zeit.....	51
3.3 OFT.....	53
Geschwindigkeit	53
Strecke	54
Aktivität	56
3.4 OWT	57
Aufenthaltsdauer.....	57
Anzahl der Besuche	61
3.5 FST	65
Floating.....	65
Swimming.....	67
Struggling	69
3.6 SIT	71
Anzahl der Kontakte	71
Kontaktzeit.....	71
4 Diskussion	73
4.1 Körpergewicht	73
4.2 Rota-ROD	73

4.3	OFT.....	74
4.4	OWT.....	75
4.5	FST.....	77
4.6	SIT.....	78
4.7	Zusammenfassende Beurteilung.....	79
4.8	Ausblick.....	86
5	Zusammenfassung.....	87
6	Literatur.....	89
7	Abkürzungen.....	104
8	Lebenslauf.....	105
9	Verzeichnis akademischer Lehrer.....	106
10	Danksagung.....	106
11	Puplikationen.....	107
1.1	Abstracts.....	107
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	108

1 Einleitung

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt wurden, um die Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise des Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und der Frontotemporalen Demenzen (FTD) zu verstehen, sind nach wie vor die meisten dieser Erkrankungen heute noch nicht kausal therapierbar. Die steigende Anzahl der Krankheitsfälle bei der stetig alternden Bevölkerung stellt eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem dar.

Die Entwicklung von Tiermodellen, insbesondere von Mausmodellen, hilft daher ein besseres Verständnis der Pathogenese und der Wirksamkeit neuer Therapieansätze zu gewinnen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Forschung durch die Verwendung von Tiermodellen erheblich profitieren kann. Der Anstoß für diese Entwicklung wurde auf dem Gebiet der FTD vor allem durch die Identifikation von Mutationen des Tau-Gens bei familiären Fällen dieser Erkrankung gegeben. Dennoch bilden die in der Forschung verwendeten Mausmodelle oft nur wenige Aspekte der betreffenden Krankheiten ab, und können nicht die Gesamtheit der klinischen Auffälligkeiten reflektieren.

Die Einleitung dieser Arbeit soll eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten klinischen und neuropathologischen Befunde der Gruppe der FTD geben. Im Besonderen soll im zweiten Teil der Einleitung auf den genetischen Hintergrund und die Neuropathologie der FTD mit Parkinson assoziiert mit Chromosom 17 (FTDP-17), eine familiäre Unterform der FTD eingegangen werden. Ein Schwerpunkt soll hier auf der Mutation R406W, die auch in dieser Arbeit im Tiermodell untersucht wird, liegen. Der dritte Teil der Einleitung stellt die bisher untersuchten Mausmodelle der FTDP-17, im Einzelnen, die auch in dieser Arbeit untersuchten Mausmodelle RW und hWT vor und schildert im letzten Kapitel der Einleitung den Hintergrund der in dieser Arbeit verwendeten Testmethoden. Die Einleitung endet mit der Beschreibung der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.

1.1 Frontotemporale Demenz

Die FTD ist eine Form der fortschreitenden Degeneration von Hirnsubstanz, die vor allem den Frontal- und Temporallappen betrifft. Im Gegensatz zur Demenz vom Alzheimer-Typ steht klinisch nicht die Beeinträchtigung von Gedächtnisfunktionen und der Orientierung im Vordergrund, sondern vielmehr eine progrediente Veränderung der Persönlichkeit, des Antriebes und des sozialen Verhaltens der Patienten (Neary et al., 1998).

Der erste klinische Fall dieser Erkrankung wurde von Arnold Pick 1892 (Pick, 1892) beschrieben. Damit war er der Namensgeber der oft verwendeten Synonyme Morbus Pick oder Pick'sche Atrophie. Die Diagnose des Morbus Pick ist per Definition histologisch an das Vorhandensein von sogenannten Pick-Körpern (kugelförmige intraneuronale Einschlusskörper) und Pick-Zellen (blasse aufgeblähte Nervenzellen) und die Abwesenheit von arteriosklerotischen Plaques und Alzheimer-typischen Befunden gebunden, der Nachweis der Diagnose ist somit erst *post mortem* möglich (Greck et al., 2000). Das klinische Syndrom der FTD kann aber bei histologisch unterschiedlichen atrophischen Prozessen auftreten. M. Pick im eigentlichen Sinne ist daher nur eine Untergruppe der FTDs, daher wird aktuell empfohlen, den Begriff Pick Komplex synonym mit der klinisch, ätiologisch und neuropathologisch heterogenen Gruppe der Frontotemporalen Lappen-Degeneration (FTLD) zu verwenden, welche sich klinisch als FTD manifestiert.

Epidemiologie

Die Frontotemporale Demenz gehört - nach der Demenz vom Alzheimer-Typ und der vaskulären Demenz - zu den häufigsten Formen der Demenz. Sie hat in Europa eine Prävalenz von 5-15/100.000 in der Gruppe der 45-65 Jährigen (Bird et al., 1999; Ratnavalli et al., 2002; Rosso et al., 2003). Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 57 Jahren, die mittlere Krankheitsdauer bis zum Tod beträgt 6-8 Jahre (Rosso et al., 2003). Die meisten Fälle der FTD treten sporadisch auf, in 20-30% lässt sich eine familiäre Häufung nachweisen (Poorkaj et al., 2001; Rosso et al., 2003). Die meisten dieser familiären Formen sind durch Mutationen im Tau-Gen auf Chromosom 17q21 verursacht (Morris et al., 2001; Poorkaj et al., 2001; Rosso et al., 2003). Sie werden daher als Frontotemporale Demenz mit Parkinson assoziiert mit Chromosom 17 (FTDP-17) bezeichnet. Zusätzlich erwähnenswert ist, dass ein beträchtlicher Teil (20-40%) der familiären FTD nicht durch Mutationen auf dem Tau-Gen verursacht wird (Rosso et al., 2001). Bei einigen Familien lassen sich histopathologisch Veränderungen nachweisen (Ubiquitin-positive, Tau-negative Zelleinschlüsse), die z.B. auf eine Mutation im Progranulin-Gen auf Chromosom 17q21-22 zurückgeführt werden konnte (Cruts et al., 2006). Weiterhin können auch Ubiquitin-positive Einschlüsse bei familiären Fällen mit einem Locus auf Chromosom 9 nachgewiesen werden

(Hosler et al., 2000; Vance et al., 2006). Ebenfalls auf Chromosom 9 lokalisiert sind Mutationen des Valosin-containing-Proteins, welche sich klinisch in einer familiären FTD mit Einschlusskörperchen-Myopathie und Morbus Paget manifestieren (Watts et al., 2004). In einem Großteil dieser Fälle handelt es sich bei den Ubiquitin-positiven Einschlüssen um das Protein TDP-43, welches bei der DNA Transkription und beim Spleißen eine wichtige Rolle spielt (Rabinovici und Miller 2010). In einer dänischen Familie mit FTD und Amyotropher Lateralsklerose konnte die Ursache der Mutationen im CHMP2B-Gen („charged multivesicular body protein 2 B“) auf Chromosom 3 nachgewiesen werden (Parkinson et al., 2006). Der Vererbungsmodus ist meist autosomal-dominant. Das mittlere Erkrankungsalter und die durchschnittliche Überlebensdauer unterscheiden sich nicht von den sporadischen Formen der FTD.

Einteilung und klinisches Bild

Die ersten Arbeitsgruppen, die sich um eine einheitliche Einteilung der FTD bemühten waren aus Lund (Schweden) und Manchester (England). Durch ihre Arbeiten, die 1994 erschienen, wurde durch die Definition klinischer Kriterien festgelegt, dass die Diagnose einer FTD auch unabhängig von der Histologie gestellt werden kann (The Lund and Manchester Groups, 1994). Mit den Jahren sind viele Vorschläge zu einer Einteilung nach klinischen Kriterien verfasst und wieder vereinfacht worden, um die Anwendbarkeit in der Praxis zu gewährleisten. Der Oberbegriff Frontotemporale Lobärdegeneration (FTLD) wurde nach einem Vorschlag von Kertesz und Munoz (1998) eingeführt, unter dem die folgenden klinischen Syndrome zusammengefasst wurden:

- Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus bei Mutationen auf dem Chromosom 17 (FTDP- 17)
- Frontotemporale Demenz (FTD)
- Primär progrediente Aphasie (PPA)
- Semantische Demenz (SD)
- Kortikobasale Degeneration (CBD)

Neary et al. veröffentlichten noch im selben Jahr eine vereinfachte Darstellung, nach der die FTLD in nur drei klinisch definierte Prägnanztypen eingeteilt wird (Neary et al., 1998):

- Frontale/frontotemporale Verlaufsform (d.h. FTD sensu stricto, im weiteren Text in diesem Sinne gebraucht)
- PPA
- SD

Bei der PPA handelt es sich klinisch um eine nicht-flüssige Aphasie mit bildmorphologisch nachweisbarer links temporalen Atrophie.

Im Gegensatz lässt sich bei der SD eine bitemporale Atrophie nachweisen, klinisch imponiert eine multimodale Störung des Verständnisses, die Patienten verlieren die Fähigkeit Wörter zu benennen und zu verstehen sowie Gesichter, Objekte und sensorische Stimuli zu erkennen.

Die FTD stellt den Haupttyp dar und ist klinisch durch eine führende Wesensänderung und abnormes Verhalten gekennzeichnet. Vor allem Änderungen des Affekts und Mangel an Einsicht grenzen diese Gruppe von der Alzheimer-Demenz und den vaskulären Demenzen ab (Bathgate et al., 2001; Snowden et al., 2001; Rankin et al., 2005). Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch einen schleichenden Beginn und eine allmähliche Progredienz der Symptomatik. Patienten, die an einer FTD leiden, mangelt es an basalen Emotionen. Demnach können sie keine Empathie und Sympathie empfinden. Sie sind nicht in der Lage in der Mimik oder der Stimmlage eines Interaktionspartners Emotionen zu deuten. Dies führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung der sozialen Interaktionen (Keane et al., 2002; Rosen et al., 2002, 2004; Lavenex et al., 2005). Weiterhin zeigt sich im Verlauf der Erkrankung eine Verflachung des Affektes. Die betroffenen Patienten haben keine Krankheitseinsicht. Bilder von Antriebssteigerung, die vor allem bei männlichen Patienten vorkommt bis zu einer ausgeprägten Antriebslosigkeit können vorkommen. Ein allmählicher Verlust des Sprachantriebs ist häufig, im Endstadium der Erkrankung kann sich eine ausgeprägte Spracharmut bis zum Mutismus zeigen. Bei der primär progredienten Aphasie kommt es (v.a. bei Rechtshändern) durch eine links betonte Atrophie des Frontal- und Temporallappens zu einer ausgeprägten Sprachstörung. Die Patienten sprechen oft abgehackt und stockend (Greck et al., 2000). Beeinträchtigungen der kognitiven Funktionen wie Urteilsvermögen, Planung, Problemlösung, Aufmerksamkeit und Abstraktionsvermögen kommen vor, wobei die Gedächtnisfunktion lange intakt bleibt (Hodges et al., 1999; Kramer et al., 2003). Weitere Befunde bei Patienten mit FTD sind Auffälligkeiten in der klinisch-neurologischen Untersuchung wie beispielsweise Akinese, Rigor und Tremor. Dies tritt vor allem bei den familiären Formen der FTD (z.B. FTDP-17) und meist spät im Verlauf der Erkrankung auf.

Um den klinisch arbeitenden Kollegen eine differentialdiagnostische Abgrenzung von den anderen Demenzformen zu erleichtern und damit die Diagnosestellung zu vereinfachen wurden 2001 von McKhann and Colleagues (2001) eine Reihe von klinischen Kriterien definiert:

- Frühe und schnell fortschreitende Veränderungen der Persönlichkeit und der Sprache
- Beeinträchtigung im sozialen und beruflichen Umgang
- Stufenartig und progressives Fortschreiten der Erkrankungen

- Ausschluss anderer Ursachen
- Defizite dürfen nicht durch ein vorübergehendes Delir bedingt sei
- Ausschluss psychiatrischer Erkrankungen, vor allem der Depression

Ebenfalls eine gute Übersicht über die klinischen Auffälligkeiten und Untersuchungsbefunden stellt die folgende tabellarische Abbildung der „Allgemeinen Richtlinien für die klinische Diagnose der Frontotemporalen Demenz“ von Neary et al. aus dem Jahr 1998 dar (Neary et al., 1998).

Kernsymptome
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Plötzlicher Beginn und stufenartiger Verlauf ▪ Ablehnen von sozialen Kontakten ▪ Beeinträchtigung in der Organisation von sozialen Kontakten ▪ Emotionale Abstumpfung ▪ Verlust an Einsicht
Unterstützende Symptome
<i>Verhaltensauffälligkeiten</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vernachlässigung der eigenen Hygiene ▪ Mentaler Starrsinn und Inflexibilität ▪ Ablenkbarkeit und Unbeständigkeit ▪ Hyperoralität and Änderung der Essgewohnheiten ▪ Stereotypes Verhalten ▪ Ausnutzendes Verhalten
<i>Sprache</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Abnahme der Sprachproduktion ▪ Stereotype Sprachweise ▪ Echolalie ▪ Perseveration ▪ Mutismus
<i>Körperliche Symptome</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positive Primitivreflexe ▪ Inkontinenz ▪ Akinese, Rigor und Tremor ▪ Arterielle Hypotonie
<i>Untersuchungen</i>
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Neuropsychologische Testung: signifikante Beeinträchtigung der frontalen Hirnfunktionen, Ausschluss von Aphasie, Amnesie oder Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses ▪ EEG: normal ▪ Bildgebung: Atrophie des Frontal- und des anterioren Temporallappens

Abb. 1: Übersicht über die klinischen Befunde sowie die diagnostischen Kriterien der FTD entsprechend der „allgemeinen Richtlinien für die klinische Diagnose der Frontotemporalen Demenz“ (Neary et al., 1998).

Um die Diagnose einer FTD stellen zu können ist der wichtigste diagnostische Schritt die ausführliche Erhebung der Fremdanamnese. Durch die mangelnde Krankheitseinsicht der Patienten, vor allem bezüglich ihrer Defizite im Alltag, ist eine Eigenanamnese oft schwierig. Verhaltensauffälligkeiten werden von den Patienten selbst oft nicht bemerkt. Die im klinischen Alltag häufig verwendeten Demenztests (z.B. Mini-Mental-Test) legen den Schwerpunkt hauptsächlich auf die Erfassung von mnestischen und visuo-konstruktiven Funktionsstörungen. Daher sind sie, vor allem im Anfangsstadium, für die Diagnosestellung einer FTD nicht wegweisend. Daher ist der Einsatz von speziell auf die FTD zugeschnittene Tests wichtig und unumgänglich wie z.B. der FAB-Bedside-Test (Frontal Assessment Battery) (Dubois et al., 2000). Nur in einer ausführlichen neuropsychologischen Untersuchung können die, für die Erkrankung charakteristischen Merkmale zuverlässig und detailliert erfasst werden. Das EEG ist bei den meisten Patienten mit FTD normal. Die Liquordiagnostik kann die Diagnosestellung einer neurodegenerativen Erkrankung, besonders bei der Alzheimer-Demenz unterstützen. Im Liquor können Korrelate zu den neurodegenerativen Veränderungen im Gehirn nachgewiesen werden. Die aktuell klinisch relevanten Parameter, die zur Demenzabklärung durch eine Liquoranalyse bestimmt werden, sind beta-Amyloid-1-42, Tau und Phospho-Tau (phosphoryliertes Tau-Protein). In mehreren großen Studien konnten eine hohe Sensitivität und Spezifität für die kombinierte Messung dieser Parameter zur Abgrenzung einer Demenzerkrankung gegenüber Gesunden nachgewiesen werden (Sunderland et al., 2003). Die Unterscheidung der Demenzformen ist aber nicht im ausreichenden Maß möglich (Mitchell 2009). Darüber hinaus können auch erhöhte Werte für Tau bei anderen Erkrankungen des ZNS (z.B. Creutzfeld-Jacob-Erkrankung, vaskuläre Demenz, Trauma, Tumor) nachgewiesen werden (Andreasen et al. 1998; Blennow et al., 2003). Zur differentialdiagnostischen Abgrenzung zu anderen Erkrankungen sind auch bildgebende Verfahren sinnvoll. cMRT und CCT sind strukturelle bildgebende Verfahren und können bei den meisten Patienten mit einer FTD eine Atrophie des Frontal- und/oder des Temporallappens nachweisen. Bei der PPA ist diese links-hemisphäral betont. Mittels SPECT und PET können ergänzend eine Hypoperfusion und ein Hypometabolismus in diesen Hirnregionen nachgewiesen werden (Greck et al., 2000); diese nuklearmedizinischen Untersuchungen sind möglicherweise sensitiver als die morphologische MRT-Untersuchung.

1.2 Frontotemporale Demenz mit Parkinson assoziiert mit Chromosom 17

Die FTDP-17 ist eine autosomal-dominant vererbte familiäre Form der FTD. Weltweit sind mehr als fünfzig Familien in Europa, Japan, Australien, Canada und den USA von der Erkrankung betroffen. Auffällig bei den Erkrankten sind klinisch vor allem aggressives und obsessives Verhalten, Sprachstörungen bis zum Mutismus bei fehlenden oder nur minimalen Gedächtnisdefiziten. Die Betroffenen erkrankten zwischen dem zwanzigsten (Familie Sperfield) und dem fünfundsiebzigsten Lebensjahr (Familie FTD004) starben nach durchschnittlich acht Jahren (Reed et al., 2001). Erst im Jahr 1994 gelang es Wilhelmsen und Mitarbeitern (Wilhelmsen et al 1994; Wijker et al., 1996) diese familiär gehäuft vorkommende Erkrankung auf eine Mutation des Tau-Proteins auf Chromosom 17q21 zurückzuführen. Sie wurde von ihnen ursprünglich als „disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy-complex“ beschrieben.

Der Begriff der FTDP-17 wurde 1996 durch die Konferenz in Ann Arbor (Michigan, USA) geprägt, nachdem bei dreizehn Familien mit klinischer FTD Mutationen auf dem Chromosom 17 nachgewiesen werden konnten (Foster et al., 1997). Die Bezeichnung FTDP-17 umfasst eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die meist autosomal-dominant vererbt werden und sich in ihrer klinischen Ausprägung sowie in ihren neuropathologischen Aspekten überschneiden (Foster et al., 1997). In den darauf folgenden Jahren wurden weitere familiäre Fälle mit Mutationen auf Chromosom 17q21 nachgewiesen (Wijker et al., 1996; Bird et al., 1997; Foster et al., 1997; Heutink et al., 1997; Murrell et al., 1997; Lendon et al., 1998), wodurch eine Funktionsstörung des Tau-Proteins als Ursache neurodegenerativer Erkrankungen nicht mehr verneint werden konnte (Spillantini et al., 1998; Hutton et al., 1998; Talbot et al., 1998; Sperfeld et al., 1999). Bis heute sind 40 unterschiedliche Mutationen des Tau-Gens auf Chromosom 17 identifiziert worden. Die klinische Ausprägung der FTDP-17 ist unterschiedlich und variiert mit der Art oder der Lokalisation der Mutation. Es können verschiedene klinische Phänotypen bei derselben Mutation, auch innerhalb einer Familie auftreten. Diese reichen von dem typischen Bild einer FTD bis hin zu einem eher Alzheimer-typischen Bild (Lindquist et al., 2008). Häufig sind Veränderungen der Persönlichkeit, enthemmtes Verhalten wie zum Beispiel „Duzen“ oder Anfassen von fremden Personen, Aggressivität, Sprachstörungen bis zum Mutismus, Hyperoralität und das Auftreten von extrapyramidalen (Parkinson) Syndromen und kognitiven Defiziten. Auch psychiatrische Symptome wie beispielsweise Depressionen kommen vor (Reed et al., 2001).

Während bei dem überwiegenden Teil der Betroffenen mit FTDP-17 die Erkrankung früh beginnt, rasch fortschreitet und schnell (8-10 Jahre) zum Tod führt (Bird et al., 1999; Kobayashi et al., 2003), wird für manche Patienten (Typ R406W-Mutation) ein langsamer Verlauf mit Überlebenszeiten von bis zu 25 Jahren beschrieben (Kobayashi et al., 2003; Murrell et al., 1999). Der klinische Phänotyp der Erkrankungsfälle mit R406W-Mutation entspricht

überwiegend dem Bild einer Demenz vom Alzheimer-Typ, mit frühen kognitiven Beeinträchtigungen (Ostojic et al., 2004; Lindquist et al., 2008), aber auch Fälle mit frühem Krankheitsbeginn, schnell progressivem Verlauf und einer klinisch typischen FTD mit Auffälligkeiten im Verhalten kommen vor (Saito et al., 2002).

Tau-Protein und Neurodegeneration

Das Tau-Protein ist ein Phosphoprotein, das zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) gehört. Es wurde 1975 erstmals von Weingarten (Weingarten et al., 1975) beschrieben. Mikrotubuli sind zytoskelettale Filamente, gebildet aus Tubulin-Polymeren und dienen als „Schienen“ für intrazelluläre Transportprozesse. Durch die Bindung an Tubulin ist Tau am Auf- und Abbau und bei der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt. Eine weitere physiologische Funktion ist der Transport von Proteinen und Zellorganellen. Tau kommt hauptsächlich in Axonen der Neurone vor (Binder et al., 1985), findet sich aber in kleinen Mengen auch in Astrozyten und Oligodendrozyten. Seine Funktion wird über zwei Wege kontrolliert: durch die Expression von verschiedenen Tau-Isoformen und durch den Grad der Phosphorylierung des Proteins. Der C-Terminus des Tau-Proteins ist für die Bindung an Mikrotubuli zuständig (Mandelkow et al., 1996). Der N-Terminus, welcher auch Projektionsdomäne genannt wird, ist für die Interaktion zwischen Tau-Protein und dem Zytoskelett sowie mit der Plasmamembran zuständig. Weiterhin bestimmt er den Abstand der Mikrotubuli zueinander (Brandt et al., 1995; Hirokawa et al., 1988).

Das menschliche Tau-Protein wird auf dem MAPT-Gen auf Chromosom 17q21 kodiert. Dieses beinhaltet 16 Exons (E1-E6). Im menschlichen Gehirn kommen sechs verschiedene Isoformen des Tau-Proteins vor, die sich u.a. durch ihre Anzahl an Mikrotubuli-bindenden Aminosäuresequenzen (352-441) unterscheiden. Die Expression von Exon 3 ist an die Expression von Exon 2 gebunden. Das alternative Spleißen der Exons 2 und 3 resultiert in Isoformen ohne Exon 2 und 3 (N0), mit Exon 2 (N1) oder mit Exon 2 und 3 (N2) im N-Terminus der Tau-Protein Projektionsdomäne. Am C-Terminus finden sich drei- oder vier „Repeat“-Domänen (R1-R4), wobei jede einzelne aus 18 Aminosäure-Sequenzen besteht und durch sogenannte 13 bis 14 Aminosäuren lange Inter-Repeat-Sequenzen unterbrochen wird. Diese „Repeat“-Domänen werden durch die Exons 9-12 kodiert und stellen die Mikrotubuli-Bindungsstellen dar. Das alternative Spleißen von Exon 10 bestimmt schließlich ob eine Isoform mit drei oder vier „Repeats“ entsteht (Stamelou et al., 2010). Drei der menschlichen Tau-Isoformen weisen dementsprechend drei Mikrotubuli-bindende „Repeats“ auf (3R-Tau-Isoformen), die anderen der Isoformen haben vier „Repeats“ (4R-Tau-Isoformen).

Beim gesunden Erwachsenen sind alle 6 Isoformen im Gehirn nachweisbar und das Verhältnis zwischen 3R und 4R-Tau beträgt 1:1, wobei die Anteile von N0, N1 und N2 37%, 54% und 9% betragen (Kosik et al., 1989; Goedert und Jakes, 1990).

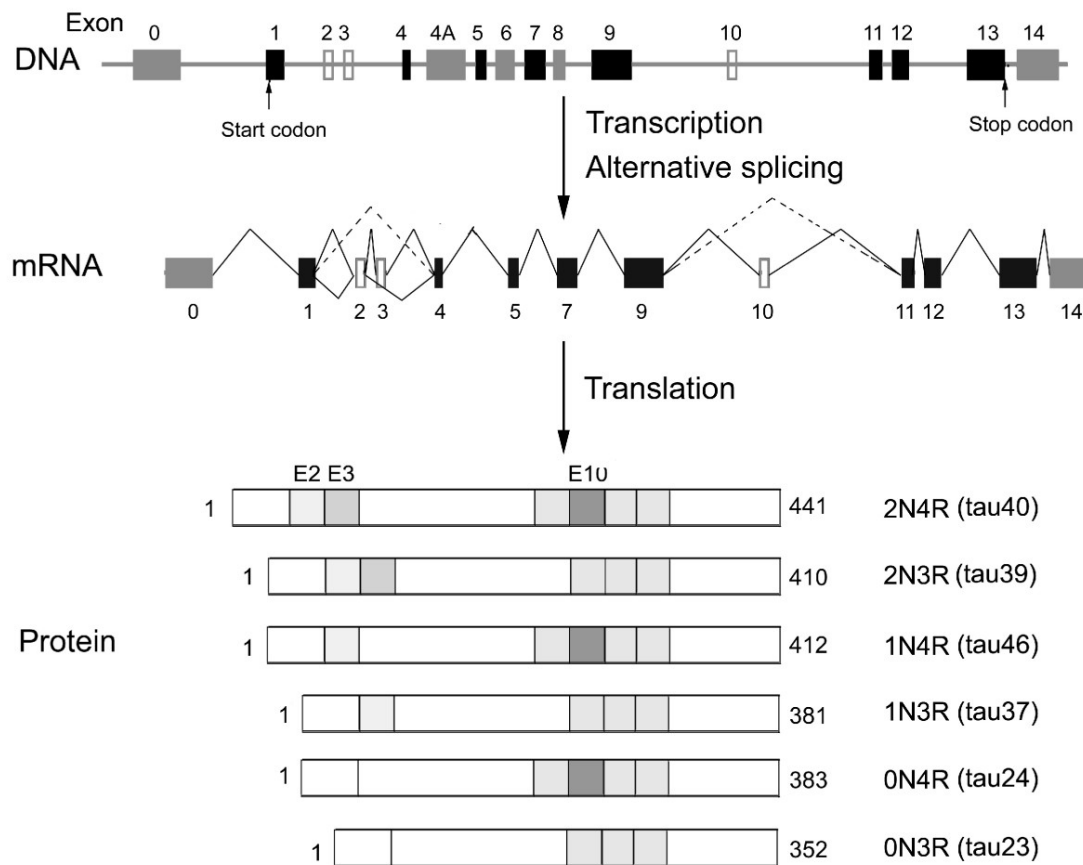


Abb. 2: Darstellung des Tau-Gens, der mRNA und der verschiedenen Tau-Isoformen. Die oberste Graphik zeigt die Struktur des Tau-Gens: die konstitutiven Exons sind als schwarze, die alternativ gespleißten Exons als graue und leere Kästen abgebildet. Die mittlere Graphik zeigt die mRNA von Tau im menschlichen adulten Gehirn. Insgesamt sechs verschiedene mRNAs können durch das alternative Spleißen der Exons 2,3 und 10 entstehen, diese sind durch die unterbrochenen und un-unterbrochenen Linien dargestellt. Die untere Graphik zeigt die 6 Tau-Isoformen des menschlichen Gehirns, die sich u.a. durch ihre Anzahl an Mikrotubuli-bindenden Aminosäuresequenzen (352-441) unterscheiden. Drei der Isoformen weisen drei Mikrotubuli-bindende Aminosäuresequenzen („Repeats“) auf (3R-Tau), die anderen vier (4R-Tau), dargestellt als hell graue Boxen. Sie entstehen durch das alternative Spleißen der Exons 2, 3 und 10 und unterscheiden sich durch die Anzahl von Aminosäuresequenzen (N0), (N1), (N2). Diese „Repeat“-Domänen werden durch die Exons 9-12 kodiert und stellen die Mikrotubuli-Bindungsstellen dar. Das alternative Spleißen von Exon 10 (dunkel graue Boxen) bestimmt ob eine 3R- (E10-) oder eine 4R-Isoform (E10+) entsteht (aus: Liu und Gong, 2008).

Als Phospho-Protein wird Tau nach der Translation durch verschiedene Kinasen phosphoryliert, dieser Schritt ist für die Regulation der Tau-Mikrotubuli-Interaktion sehr entscheidend. Zu den Kinasen die Tau-Protein *in vitro* phosphorylieren können zählen beispielsweise die Calcium-Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII), die Caseinkinase II, die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAMP-PK) und die ERK2 (Protein Extracellular Signal regulated Kinase), die auch als MAP (Mitogen-activated Protein Kinase) bekannt ist, die CDK-5 (Cyclin-dependent Protein Kinase 5) sowie die GSK3 (Glykogensynthase Kinase 3) (Johnson et al., 1992; Greenwood et al., 1994; Drewes et al., 1992; Mandelkow et al., 1992, Gong und Iqbal 2008).

Bei der FTDP-17 liegt Tau in einer abnormen, hyperphosphorylierten und unlöslichen Form vor (Reed et al., 2001), akkumuliert im neuronalen Soma und verliert dadurch seine natürliche Funktion. Die intrazellulären Tau-Ablagerungen werden NFT („neurofibrillary tangles“) genannt. Ultrastrukturell können diese aus gepaarten helikalen Filamenten (PHF für „paired helical filaments“) oder geraden Filamenten (SF für „straight filaments“) bestehen, deren wesentliche molekulare Komponente hyperphosphoryliertes Tau-Protein ist (Goedert et al., 1988; Kondo et al., 1988; Kosik et al., 1988; Lee, Goedert und Trojanowski, 2001). Ein erhöhter Grad an Phosphorylierung führt zu einer veränderten Bindung zwischen Tau-Protein und Mikrotubuli, wodurch die Stabilität und Funktion der Mikrotubuli beeinträchtigt wird.

Pathogenese und Neuropathologie

Die aktuell 40 bekannten Mutationen werden nach ihrer Lokalisation auf dem Tau-Gen eingeteilt. Die Lokalisation bestimmt ihren Effekt auf die Tau-mRNA, auf das Tau-Protein und die Art der resultierenden Tau-Pathologie. Mutationen der Exons 1, 9, 12 und 13 beeinflussen, wie bereits beschrieben, alle 6 Tau-Isoformen. Im Gegensatz dazu werden bei den Exon 10 betreffenden Mutationen nur die 4R-Isoformen oder ihre Expression verändert. Bei den die Introns betreffenden Mutationen und auch bei einigen Missense-Mutationen kommt es zu einer Beeinflussung von Elementen, die das Spleißen von Exon 10 regulieren, sie führen somit wiederum zu einer Veränderung der relativen Expression der Tau-Isoformen. Zusammengefasst können die pathogenetischen Auswirkungen der FTDP-17 assoziierten Mutationen anhand ihrer molekular-biologischen Mechanismen in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe beeinflusst die Tau-Mikrotubuli Interaktion, die zweite die Ausbildung von Neurofibrillen durch gesteigerte Tau-Aggregationsneigung und die dritte Gruppe das alternative Spleißen von Exon 10. Einige Mutationen wirken sich über mehrere Mechanismen aus. Die Tau-Mikrotubuli-Interaktion wird dabei durch die Mutationen entweder erhöht (z.B. S305N, Q336R) oder erniedrigt (z.B. R5H, R5L, K257T, N296H, P301L, P301S), kann aber auch unbeeinträchtigt bleiben (N279K). Mutationen, die eine erniedrigte Affinität bewirken sind vor allem Missense Mutationen, die in der Mikrotubuli-Bindungsdomäne liegen (Exons 9,11, 12 und 13). Eine Ausnahme stellt hier die Q336R Mutation auf Exon 12 dar, da diese zu einer Erhöhung der Mikrotubuli-Bindungs-Affinität führt (Gasparini et al., 2007).

Viele der Mutationen können zusätzlich die Ausbildung von Neurofibrillen fördern. Sie verfügen über stimulatorische Effekte die sich direkt auf die Heparin-induzierte Tau-Filament-Ansammlung *in vitro* auswirken und somit zur Ausbildung von Tau-Aggregaten führen. Diese können je nach Typ der Mutation aus spezifischen Tau Isoformen (z.B. nur 4R-Tau) bestehen. Beispielsweise führt die K257T-Mutation zu einer Heparin-induzierten Filamentbildung aus 3R-Tau *in vitro*.

Mutation	Lokali- sation	Mikrotubuli- Bindung <i>in vitro</i>	Tau-Aggregation <i>in vitro</i>	Effekt auf das Spleißen von Exon 10
R5H	E1	vermindert	stimuliert	kein Effekt
R5L	E1	vermindert	n.b.	kein Effekt
K257T	E9	vermindert	stimuliert	kein Effekt
I260V	E9	vermindert	stimuliert	n.b.
L266V	E9	vermindert	stimuliert	verstärkt
G272V	E9	vermindert	stimuliert	n.b.
N279K	E10	unverändert	n.b.	verstärkt
△K280	E10	vermindert	stimuliert nur 4R-Tau	vermindert
L284L	E10	n.b.	n.b.	verstärkt
△N296	E10	vermindert	stimuliert/unverändert	verstärkt
N296H	E10	vermindert	stimuliert	verstärkt
N296N	E10	n.b.	n.b.	verstärkt
P301L	E10	vermindert	stimuliert 4R-Tau	kein Effekt
P301S	E10	vermindert	stimuliert 4R-Tau	n.b.
G303V	E10	n.b.	n.b.	verstärkt
S305N	E10	verstärkt	n.b.	verstärkt
S305S	E10	n.b.	n.b.	verstärkt
L315R	E11	vermindert	n.b.	n.b.
K317M	E11	vermindert	n.b.	n.b.
S320F	E11	vermindert	n.b.	n.b.
G335V	E12	vermindert	stimuliert	n.b.
Q336R	E12	verstärkt	stimuliert	n.b.
V337M	E12	vermindert	stimuliert nur 3R-Tau	n.b.
E342V	E12	vermindert	n.b.	verstärkt
S352L	E12	vermindert	stimuliert	n.b.
K369I	E12	vermindert	stimuliert	n.b.
G389R	E13	vermindert	n.b.	n.b.
R406W	E13	vermindert	unverändert	n.b.
T427M	E13	n.b.	n.b.	n.b.

Tab. 1: Mutationen in der Kodierungsregion des Tau-Gens. n.b.= nicht bestimmt; E= Exon (aus: Gasparini et al., 2007).

Ein Großteil der die Introns betreffenden Mutationen ist auf dem Exon 10 folgenden Introns lokalisiert und beeinflusst dadurch das alternative Spleißen von Exon 10. Dies führt zu einer Überexpression der 4R-Tau-Isoformen, die eine höhere Tendenz als 3R-Tau-Isoformen besitzen, sich zu Neurofibrillen abzulagern. Lediglich die intronische Mutation +19 reduziert das Spleißen von Exon 10 und bewirkt dadurch eine Überexpression an 3R-Tau-Isoformen (Stanford et al., 2003). Zu den wenigen exonischen Mutationen die das alternative Spleißen von Exon 10 beeinflussen gehören die Missense-Mutationen N279K, G303V und S305N sowie die stillen Mutationen L284L, N296N und S305S (Gasparini et al., 2007). Das mRNA-Spleißen

wird über unterschiedliche Mechanismen beeinflusst. Die Mutationen zerstören beispielsweise die sekundäre Struktur der mRNA oder verändern regulatorische Sequenzen (Varani et al., 1999). Eine Analyse der Sekundärstruktur der mRNA zeigte das Vorhandensein einer stabilen „stem-loop“-Struktur an Übergangsstelle zwischen Exon 10 und den folgenden Introns (Abbildung 3). Alle bisher bekannten intronische Mutationen beeinflussen die thermodynamische Stabilität dieser Struktur (Varani et al., 1999). Auch die Missense Mutation in Position 305 zeigt einen ähnlichen Effekt. Durch die S305N-Mutation kommt es zu einem Austausch der letzten Aminosäure im Exon 10. Dies hat zur Folge, das ähnlich wie bei der intronischen Mutation +3 die Bindung des Spleiß-Faktors U1 an die 5'-Spleißstelle der snRNA verstärkt und das Spleißen von Exon 10 erhöht wird (Hutton et al., 1998; Varani et al., 1999). Ein alternativer Mechanismus ist die Beeinflussung von regulatorischen Sequenzen des Tau-Gens. Mehrere Mutationen, die in der Kodierungs-Region lokalisiert sind (z.B. N279K, L284L) verändern regulatorische Sequenzen und verstärken somit wiederum das Spleißen von Exon 10 (D'Souza et al., 2002).

Alle bestätigten Fälle von FTDP-17 die bis heute neuropathologisch untersucht wurden, weisen typischerweise filamentöse Aggregate auf, die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen (Spillantini et al., 1998). Diese können sich je nach Typ der zugrunde liegenden Mutation anhand ihrer Morphologie, der Zusammensetzung aus den Tau-Isoformen und anhand der Verteilung der Filamente und Ablagerungen unterscheiden. Bei den meisten Missense-Mutationen, die wie bereits beschrieben zu einer erniedrigten Mikrotubuli-Bindung des Tau-Proteins führen finden sich die pathologischen Veränderungen vor allem in Neuronen; Gliazellen sind weniger betroffen (Lee et al., 2001; Ingram und Spillantini, 2002). Ausnahmen sind die R5H- und die L315R-Mutationen, bei denen sich ein überwiegender Anteil an pathologisch veränderten Gliazellen im Vergleich zur neuronalen Beteiligung nachweisen lässt (Hayashi et al, 2002; van Herpen et al., 2003).

Die histopathologischen Veränderungen in Neuronen bestehen aus „neurofibrillären Tangles“ (NFT), Pick-Körperchen und Neuropilfäden (K257T, L266V, R406W). NFT sind intraneuronale Einschlüsse, die sich im Perikaryon und in den proximalen Neuriten finden. Sie sind irregulär begrenzt und färben sich unterschiedlich intensiv mit Silber. Pick-Körperchen wurden erstmals 1911 von Alois Alzheimer beschrieben und sind runde oder ovale Einschlüsse mit homogener und intensiver Agyrophilie. Pick-Zellen („ballooned cells“) sind Neurone mit einem erweiterten Zytoplasma. Neuropilfäden sind Tau-Ablagerungen in Neuriten.

Die weniger verbreiteten Veränderungen der Gliazellen bestehen aus „coiled bodies“ (L266V, K369I) und agrophilen Astrozyten (L266V) sowie „astrozytären Tuffs“ (L315R, K369I). „Coiled bodies“ erscheinen Komma- oder Sechsförmig und finden sich typischerweise in Oligodendrozyten, vor allem in der weißen Substanz. „Astrozytäre Tuffs“ sind durch eine intensive, die gesamte Zelle betreffende Tau-Färbung gekennzeichnet. Bei einigen Mutationen

finden sich auch dystrophische Neuriten und astrozytische Plaques, diese weisen typischerweise nur in den distalen Anteilen Einschlüsse mit Tau-Protein auf.

Alle Ablagerungen bestehen aus Tau-Filamenten, die entweder aus SF oder PHF aufgebaut sind (Abbildung 4). PHF bestehen aus zwei, umeinander gedrehte Filamente mit einer Periodizität von 80 nm. Ihr Durchmesser variiert zwischen 8 und 20 nm. SF finden sich im Vergleich zu den PHF in geringerer Form und verfügen nicht über eine helicale Periodizität (Spillantini und Gasparini, 2007).

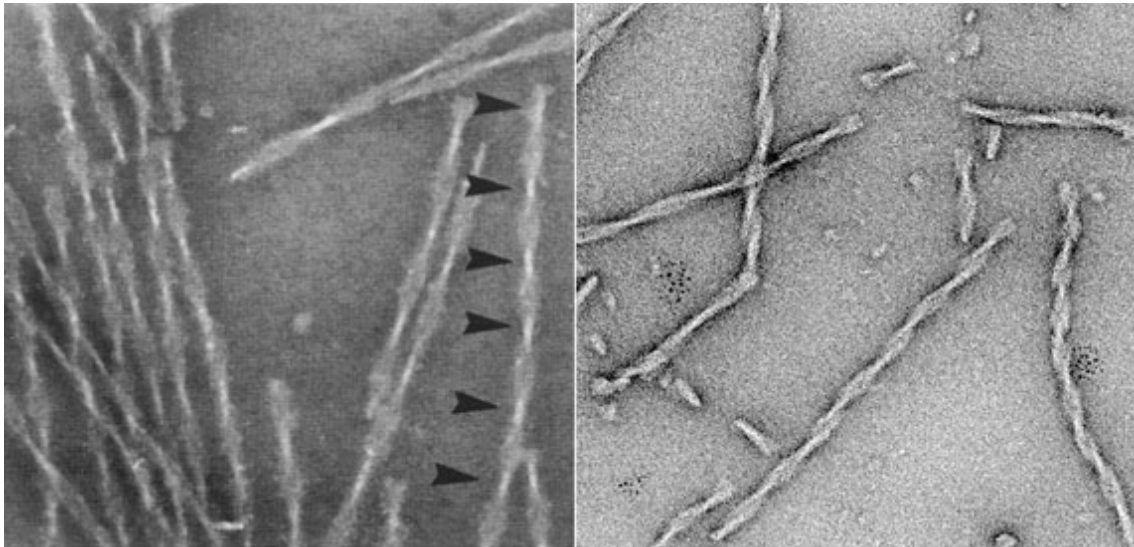


Abb. 4.: Elektronenmikroskopische Darstellung von PHF (links) beim M. Alzheimer. Typisch ist die ineinander verdrehte Struktur der PHF (rechts). (aus: Mandelkow et al., 2007).

Beim M. Alzheimer bestehen sowohl die PHF als auch die SF aus pathologisch verändertem hyperphosphoryliertem Tau-Protein, welches sich aus allen 6 Tau-Isoformen zusammensetzt. Die Zusammensetzung der PHF aus 3R- und 4R-Isoformen ist auch bei der FTDP-17 bis auf wenigen Ausnahmen gleichmäßig. Nur bei einigen Mutationen ist das 3R/4R-Tau-Verhältnis unterschiedlich. Beispielsweise bestehen die PHF bei der E342V-Mutation hauptsächlich aus 4R-Tau-Isoformen. Bei der R406W-Mutation lassen sich SF und PHF nachweisen, die alle 6 Tau-Isoformen beinhalten und den Ablagerungen beim M. Alzheimer ähneln.

Neuropathologische und humangenetische Untersuchungen sowie Ergebnisse aus experimentellen Studien mit transgenen Tiermodellen weisen auf die zentrale Rolle des Tau-Proteins in der Entstehung der FTDP-17 hin. Der genaue Mechanismus der zur Neurodegeneration führt ist dennoch weiterhin nicht geklärt. Aktuell werden die folgenden zwei, sich gegenseitig nicht ausschließende, hypothetische Pathomechanismen diskutiert. Zum einen wird angenommen, dass sich mutiertes Tau-Protein von den Mikrotubuli ablöst. Das ungebundene phosphorylierte Tau-Protein, insbesondere 4R-Tau, neigt zur Aggregation. Diese Aggregate wiederum wirken über unterschiedliche Mechanismen toxisch auf die Zelle ein („toxic gain of function“). Zum anderen wird angenommen, dass es durch die Mutationen bzw.

durch das veränderte 3R/4R-Tau-Verhältnis zu einem Stabilitätsverlust der Mikrotubuli kommt. Diese werden zu Tubulin-Monomeren depolymerisiert und verlieren dadurch ihre Funktion im intrazellulären Transportsystem von Zellorganellen und Vesikeln („loss of function“) (Stamelou et al., 2010).

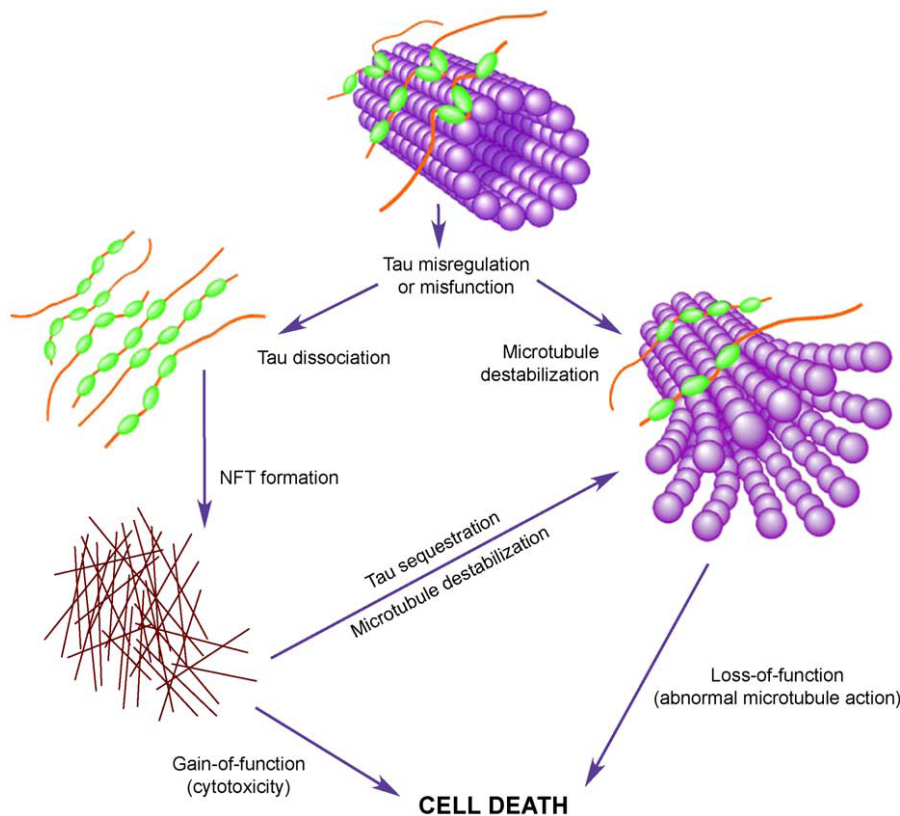


Abb. 5: „Gain-of-function“ und „loss-of-function“ Modell. Durch die Mutationsbedingten veränderten biochemischen Eigenschaften des Tau-Proteins kommt es zur Ablösung und Destabilisierung der Mikrotubuli. Durch den Stabilitätsverlust der Mikrotubuli kommt es zum Erliegen des intrazellulären Transportsystems von Zellorganellen und Vesikeln (Loss of function). Das ungebundene phosphorylierte Tau aggregiert zu NFTs, die über unterschiedliche molekulare Mechanismen toxisch wirken (Gain of function). (aus: Feinstein und Wilson 2005).

Die Hyperphosphorylierung von Tau-Protein wird durch verschiedene Kinasen verursacht, die spezifisch Serin oder Threonin des Tau-Proteins phosphorylieren. Die Glykogen-Synthetase-Kinase (GSK-3) ist eine Serin/Threonin Protein-Kinase, die in der Pathogenese vieler Tauopathien eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Sie kommt in zwei funktionell identischen Isoformen vor (alpha und beta). Mit 95% aller Phosphorylierungsstellen übernimmt sie einen Großteil des Phosphorylierungsprozesses am Tau-Protein (Johe and Johnsen, 2004) und ist mit NFT in transgenen Mausmodellen assoziiert (Ishizawa et al., 2003). Durch ihre Beteiligung in der Pathogenese bietet GSK-3 somit einen möglichen Angriffspunkt für neuere Therapieformen. Es ist nachgewiesen, dass Lithium und andere GSK-3 (beta)-Inhibitoren die Entwicklung einer Tau-Pathologie im transgenen Mausmodell beeinflussen können (Engel et al., 2006; Sereno et al., 2009).

1.3 Übersicht der Tiermodelle der FTDP-17

Nachdem es im Jahre 1998 gelang Mutationen im Tau-Protein als Ursache für Neurodegeneration und Demenz zu identifizieren (Spillantini et al., 1998; Hutton et al., 1998; Talbot et al., 1998; Sperfeld et al., 1999), wuchs auch das wissenschaftliche Interesse an dieser Form von Erkrankungen. Die Generierung von geeigneten Tiermodellen zur weiteren Erforschung der Erkrankung spielt für die Erlangung neuer Erkenntnisse über pathogenetische Zusammenhänge eine große Rolle. Durch die Einschleusung von mutiertem humanen Tau-Gen in das Genom von Mäusen ist es gelungen die histopathologischen Veränderungen der FTD im transgenen Tiermodell zu imitieren. Das erste transgene Mausmodell exprimierte die längste der Tau-Isoformen und wurde 1995 von Götz und Kollegen (Götz et al., 1995) etabliert. In den folgenden Jahren sind weitere Mauslinien gezüchtet worden, die jeweils unterschiedliche Arten von Tau-Isoformen exprimierten (Brion et al., 1999; Ishihara et al., 1999; Probst et al., 2000). Histologisch konnten bei den Mausmodellen Tau-Aggregate beobachtet werden, die mit Phospho-Tau-Antikörpern angefärbt werden konnten, aber eine nicht-filamentöse Struktur aufwiesen. Erst im hohen Alter konnten bei den Tieren auch intrazelluläre Ablagerungen in Form von NFTs sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachgewiesen werden (Allen et al., 2002; Götz 2001a; Lewis et al., 2000; Oddo et al., 2003; Tanemura et al., 2001; Tatebayashi et al., 2002). Zusätzlich auffällig waren die gehäuft vorkommenden axonalen spheroidalen Ablagerungen in Hirnstamm und Rückenmark, die aus Neurofilamenten, Mitochondrien und Vesikeln bestanden. Bei einem Großteil der betroffenen Tiere konnten motorische Defizite beobachtet werden (Wang und Liu, 2008). Eine weitere Gruppe von transgenen Mäusen wies vorwiegend gliale Ablagerungen auf (Götz et al., 2001b; Higuchi et al., 2002, 2005). Bei Tau-Knock-out-Modellen, die am ehesten einen „Loss-of-function“-Phänotyp imitieren, konnten veränderte Mikrotubuli-Ausbildungen und eine Hemmung der Neuronenreifung beobachtet werden (Harada et al., 1994; Dawson et al., 2001). Die Überexpression von 4R-Wildtyp-Tau im transgenen Mausmodell führt, durch die erhöhte Bindungsaffinität von 4R-Tau an Mikrotubuli zu einer Blockade des bi-direktionalen Transports und somit zu einer ausgeprägten Degeneration der Axone. Dieser Effekt lässt sich klinisch an motorischen Defiziten beobachten (Spittaels et al., 1999). Bei transgenen Mausmodellen mit Überexpression von humanem 4R-Tau lässt sich ebenfalls eine axonale Degeneration im Gehirn und Rückenmark nachweisen. Histopathologisch sieht man eine „Aussackung“ von Axonen die durch Ablagerung und Akkumulation von Neurofilamenten, Mitochondrien und anderen Zellorganellen entsteht. Auch diese Studie unterstützt die These, dass die Überexpression von hyperphosphoryliertem Tau-Protein den axonalen Zelltransport blockiert (Spittaels et al., 1999). Mauslinien mit reversibler Expression von humanem mutierten P301L-Tau-Protein wiesen einen ausgeprägten neuronalen Verlust im Hippocampus auf, der sich klinisch als kognitives Defizit bei den Tieren nachweisen ließ. Die folgende Unterdrückung der Expression verminderte ein Voranschreiten des

Zellverlustes und verbesserte auch die Gedächtnisleistungen der Tiere, die zugrunde liegenden neurofibrillären Ablagerungen ließen sich aber nicht beeinflussen (Santacruz et al., 2005; Spires et al., 2006). Auch die Untersuchung von Le Corre und Kollegen unterstützt die Vermutung, dass die Ausbildung von NFT nicht zwingend zu einem Neuronenverlust führt. Durch die chronische Behandlung der transgenen Mäuse mit einem Inhibitor der Kinase ERK2 resultierte in einer signifikanten Reduktion des Anteils an hyperphosphoryliertem Tau-Protein. Klinisch konnten motorische Defizite der Tiere vermieden werden, obwohl auch hier histopathologisch die gleichen Ablagerungen von NFT nachweisbar waren (Le Corre et al., 2006). Die doppeltransgene Mauslinie P301L x GSK-3 (Expression von humaner GSK-3 und humanem Tau-Protein mit P301L-Mutation) weist histopathologisch eine ausgeprägte Veränderung des Vorderhirns auf und hat verglichen mit der P301L Linie einer verlängerte Lebenserwartung (Muyllaert et al., 2006).

Mauslinie	Transgen (Promotor)	Pathologie/Verhalten	Referenz
C57BL6 C57black6/J CBA-F2 (TG23)	hTau 40/4R (human Thy1) 3R/0N (murine HMG Reduktase)	P-Tau in Zellkörpern, Axonen und Dendriten sowie in somatodendritischer Lokalisation in Neuronen und Astrozyten, v.a. der weißen aber auch der grauen Substanz (Caudatus, Putamen, Hippokampus)	Götz et al., 1995; Brion et al., 1999
B6D2/F1	htau3R/0N (murine PrP)	Unlösliches P-Tau, agyrophile intraneuronale Einschlüsse in Kortex, Hirnstamm, Rückenmark mit axonaler Degeneration und Gliose von Rückenmark, motorische Defizite	Ishihara et al., 1999
B6D2/F1	hTau40/4R (murine Thy 1,2)	Verändertes Tau-Protein in Zellkörpern und Dendriten in Gehirn und Rückenmark, Waller'sche Degeneration, neurogene Muskelatrophie und motorische Defizite	Probst et al., 2000
FVB/N	hTau40/4R2N (mouse thy 1)	Axonale Degeneration in Gehirn und Rückenmark mit Akkumulation von Neurofilamenten, Mitochondrien und Vesikeln, Reduktion der Muskelmasse	Spittaels et al., 1999
C57BL/6JxCBA/ca	P301S/3R0N (murine thy 1,2)	P-Tau und NFT in Gehirn und Rückenmark, ausgeprägte Paraparesen	Allen et al., 2002
B6D2F1 3 B6D2F1 embryos, C57BL/6 mice	P301L/4R0N (mouse thy 1,2)	P-Tau und NFT in Kortex, Hirnstamm und Rückenmark	Götz et al., 2001 a/b
C57BL/DBA2/SW (JNPL3)	hTauP301L/4R0N (mouse PrP)	NFT und Pick-Körperchen-ähnliche neuronale Läsionen, v.a. in Amygdala, Hypothalamus, Hirnstamm, Kleinhirn; Tau-immunoreaktive „Pre-Tangles“ in	Lewis et al., 2000

		Kortex, Hippocampus und Basalganglien	
B6SJL(VLWmice)	hTau G272V, P301L, and R406W/4R2N (mouse thy 1)	“Pre-tangles” und lysosomale Alzheimer-ähnliche Veränderungen	Lim et al., 2001
B6SJL (Tg 212, Tg 214, Tg 216)	V337M (platelet-derived GF-beta)	Neuronen mit P-Tau und Ubiquitin-positive Tau Aggregate in Hippocampus und Kortex	Tanemura et al., 2001
B6SJL (Tg 748, Tg 502, Tg 492, Tg 483)	hTau/R406W (α -CaMKII)	Kongophiles P-Tau im Vorderhirn, SF in Hippocampus, Amygdala und Neokortex, Gedächtnisdefizite	Tatebayashi et al., 2002
FVB/N(Tau-P301L)	P301L (mouse thy 1)	NFT, leichte motorische Defizite	Terwel et al., 2005
FVB/N (tau-KOKI)	Tau-KOKI/4R2N (mouse thy 1)	Keine nachweisbaren pathologischen Veränderungen, normale Lebenserwartung, im fortgeschrittenen Alter leichte motorische Defizite	Terwel et al., 2005
C57BL/6xC3H (GFAP/tau Tg mice)	hTau 34 (GFAP)	Verändertes Tau-Protein in Astrozyten, Störung der Blut-Hirn-Schranke, Neurodegeneration in Hirnstamm und Rückenmark	Forman et al., 2005
B6D2F1 3 B6D2F1 embryos, C57BL/6 mice (pR3, Cos-TA)	tetOp-TA-tetOp, G272V/hTau40 (a prion protein)	P-Tau und Tau-Filamente in Oligodendrozyten in Fornix, subkortikal, Cerebellum und Rückenmark	Götz et al., 2001 a/b
B6SJL/F1 (Tα1-3RT tau transgenic mice)	htau/3R (mouse T α 1 a-tubulin)	P-Tau im Zytoplasma, gliale Veränderungen der Oligodendrozyten im Hirnstamm, gliale Degeneration in Rückenmark und Vorderhorn	Higuchi et al., 2002
Tg mice lack endogenous tau	T α 1-3RT x hTau3R-KO	Tau-Pathologie und gliale Veränderungen	Higuchi et al., 2002
C57BL/C3H	P301L (2',3'-cyclic nucleotide 3'-	Behinderung des axonalen Transports, strukturelle Beeinflussung von Myelin und der	Higuchi et al., 2005

	phosphodiesterase)	Axone, Thioflavin-S-positive-Tau-Einschlüsse, motorische Defizite	
C57BL6 (3xTg-AD)	PS1 (M146V), APP (Swe), and tau (P301L/4R0N) (thy 1,2)	Neurofibrilläre Plaques und “-tangles”, synaptische Dysfunktion, Akkumulation von β -Amyloid in Hippocampus und Neokortex, Gedächtnisdefizite	Oddo et al., 2003
FVN/N [rTg (tauP301L) 4510]	301L/4R0N (CaMKII)	NFT, Neuronenverlust, Gedächtnisdefizite, Verhaltensauffälligkeiten; nach Suppression: verbesserte Gedächtnisleistungen, aber gleiche Rate an NFTs	Santacruz et al., 2005
C57BL6/CBA (THY-Tau22)	htau 46 (Thy)	NFT, Gliose in Rückenmark, frontaler Kortex und Hippocampus, Gedächtnisdefizite, gesteigerte Ängstlichkeit	Schindowski et al., 2006
C57BL (Tau-/-)	pGEM7Zf(+)	„small-caliber“-Axone, erhöhte MAP-1-Aktivität, Muskelschwäche, Hyperaktivität, Verändertes Ängstlichkeitsverhalten	Harada et al., 1994
C57BL/6 x 129SvJ (Tau KO)	PKG promotor	Verzögerte Reifung von Ausläufern der Axone und Neuriten	Dawson et al., 2001
C57BL/6 and 129/svJae	EGFP/Tau exon 1 (endogenous tau)	Tau Filamente und Akkumulation von Tau-Protein in Zellkörpern und Dendriten	Tucker et al., 2001

Tab. 2: Übersicht über die transgenen Mausmodelle mit Namen der Linie, genetischem Hintergrund, Promotor, pathologischen Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten. hTau: human Tau; P-Tau= Phospho-Tau. (aus: Wang und Liu, 2008).

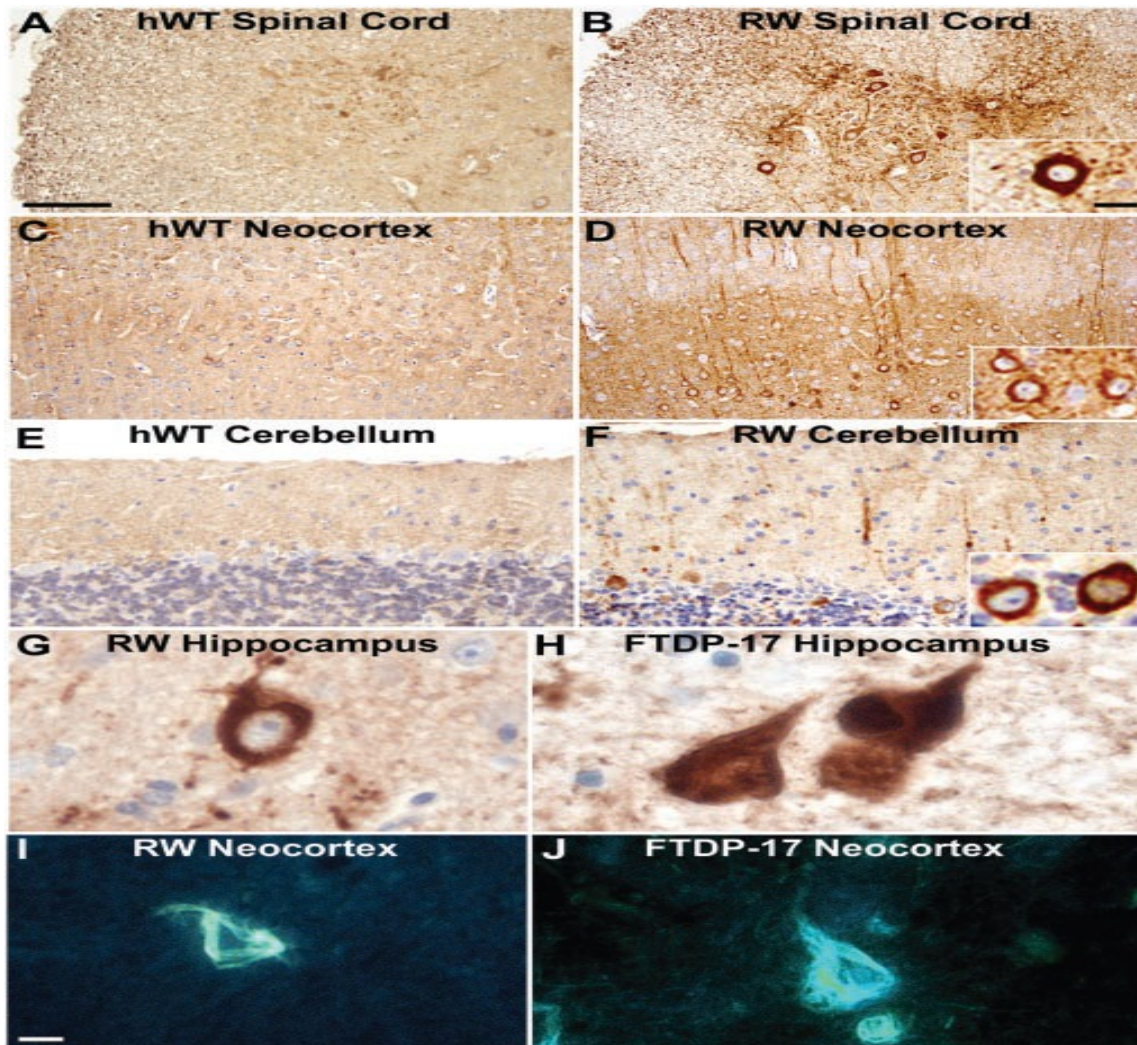


Abb. 6: A-F: Immunhistochemie mit polyklonalem Anti-Tau-Antikörper (17026) in Rückenmark (A,B), Neokortex (C,D,) und Kleinhirn (E,F) transgener hWT- und RW-Mäuse im Alter von 12 Monaten. Bei den RW-Tieren zeigt sich eine Tau-Akkumulation im Perikaryon (somatodendritisches Kompartiment), hingegen zeigen die Perikarya der hWT Tiere kaum Immunoreaktivität. G: Intensive Immunoreaktivität (Tau-AK 17026) der Perikarya im Hippocampus 18 Monate alter Tiere; ähnlich den Veränderungen im Hippocampus eines FTDP-17 Patienten mit R406W-Mutataion (H). I: Riboflavin-S-positive Neurone bei R406W-Tieren, ähnlich der NFT eines FTDP-17 Patienten mit R406W-Mutation (J) (Zhang et al., 2004).

Mausmodelle hWT und RW

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene transgene Mausmodelle hWT (humanes Wildtyp-Tau) und RW (humanes Tau mit R406W-Mutation) einbezogen die im Folgenden erläutern werden sollen. Die Gruppe hWT exprimiert die längste der sechs bekannten Tau-Isoformen (4R; 2N-Tau) und ist 441 Aminosäuren lang. Das zweite der untersuchten Modelle exprimiert diese Isoform mit einer zusätzlich eingefügten Punktmutation an der Position 406, an der die Aminosäure Arginin (R) gegen Tryptophan (W) ausgetauscht wurde.

Zur Herstellung der transgenen Mausmodelle wurden zwei cDNA Konstrukte mit der längsten Tau-Isoform (T40) mit und ohne Mutation (R406W) und unter der Kontrolle des Maus-Prion-Protein-Promotors in den Expressionsvector geklont (MoPrP.Xho). Ein 15,3 kb großes Fragment mit der T40-Isoform wurde zusammen mit dem Promotor und seinen 3' sowie 5' untranslatierten Sequenzen in eine bereits fertilisierte Mauseizelle (C57BL6 x C3H (B6C3/F1)) mikroinjiziert und anschließend in ein pseudo-trächtiges Weibchen implantiert. Mittels DNA Proben vom Schwanz des Wurfes konnten die transgenen Tiere von den nicht-transgenen unterschieden werden und anschließend homozygote Tiere gezüchtet werden. Alle Tiere entstammen folglich einem gemischten B6C3 Hintergrund (Zhang et al., 2004).

Bereits durchgeführte Studien an den oben beschriebenen transgenen Mausmodellen zeigten, dass bei den hWT-Tieren durch eine Überexpression von humanem Wildtyp-Tau histopathologisch somato-dendritische und/oder axonale Tau-Aggregate entstehen die zu einer früh beginnenden Neurodegeneration führen (Ishihara et al., 1999, 2001a,b; Spittaels et al., 1999; Probst et al., 2000; Lee et al., 2001). Bei einigen der untersuchten Tiere konnten auch Alzheimer-ähnliche NFT in Neuronen nachgewiesen werden (Ishihara et al., 2001b). Weiterhin scheint es, dass FTDP-17-typische Mutationen wie R406W (P301L, V337M) die Ausbildung der NFT beschleunigen und somit, verglichen mit den hWT-Tieren, eine schwerwiegendere Neurodegeneration indizieren (Lewis et al., 2000; Götz et al., 2001a; Tanemura et al., 2002; Lim et al., 2001; Tatebayashi et al., 2002). Der Mechanismus ist bisher aber nicht ganz verstanden. Eine mögliche Erklärung ist, dass mutiertes Tau-Protein (R406W-Mutation) (im Vergleich zum humanem Wildtyp-Tau) vermehrt im somatodendritischen Kompartiment als in den Axonen vorhanden ist und vermutlich aufgrund der Mutation eine verminderte Bindungsaffinität des Tau-Proteins zu den Mikrotubuli induziert (Hong et al., 1998; Rizzu et al., 1999; Barghorn et al., 2000; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2000). Dies führt in der Folge zu einer Hemmung des axonalen Transportes. Dieser Effekt zeigt sich auch durch eine ausgeprägte Tau-Färbung in den Perikarya der RW-Tiere, die altersabhängig sogar noch zunimmt (siehe Abbildung 6 (A-F)). In beiden untersuchten transgenen Mausmodellen (hWT, RW) aber nicht in der nicht-transgenen Kontrollgruppe, konnte eine ausgeprägte reaktive Astrozytose in Gehirn und Rückenmark beobachtet werden. Zusätzlich konnte im Hippocampus der RW-Tiere eine mit den neuronalen Tau-Veränderungen assoziierte Gliose nachgewiesen werden. Weiterhin fanden sich im Alter von 12 Monaten im Hippocampus NFTs, die den Veränderungen im Hippocampus von FTDP-17 Patienten (R406W-Mutation) ähneln (siehe Abbildung 6 (G,H)). Der Nachweis dieser Veränderungen belegt, dass die Tau-Pathologie der RW-Tiere und die der an FTDP-17-Erkrankten die gleichen strukturellen Charakteristika aufweisen (Zhang et al., 2004).

Verhaltensäquivalente der Tau-Pathologie

In einigen Studien wurden zusätzlich zu den histologischen Untersuchungen auch Daten zu Verhaltensauffälligkeiten und Gedächtnisdefiziten der transgenen Tiermodelle erhoben (Tanemura et al., 2002, Tatebayashi et al., 2002). Dabei dienten die meisten der durchgeführten Studien der Erfassung von Gedächtnisfunktionen. Für das P301L-Mausmodell sind im Alter zwischen 5 und 8 Monaten vor allem Einschränkungen des spatialen Gedächtnisses beschrieben (Arendash et al., 2004; Pennanen et al., 2004). Gegensätzliche Ergebnisse liefert eine Untersuchung der Gedächtnisleistung bei sehr jungen P301L-transgenen Mäusen. Boekhoorn und Kollegen konnten mittels des Objekt-Wiedererkennungstestes eine verbesserte Gedächtnisleistung gegenüber der nicht-transgenen Kontrollgruppe bei 5 und 9 Wochen alten P301L-Tieren nachweisen (Boekhoorn et al., 2006). Ähnliche Einschränkungen der Gedächtnisleistungen sind auch für die RW-Tiere beschrieben, die im Alter von 16 bis 23 Monaten untersucht wurden (Tatebayashi et al., 2002). Das doppel-transgene Mausmodell G272V x P301S zeigte in den Verhaltensuntersuchungen ebenfalls Gedächtnisdefizite im Alter von 10 Monaten (Schindowski et al., 2006).

Darüberhinaus konnten Pennanen und Kollegen bei 6 Monate alten P301L-transgenen Tieren eine Disinhibition für das explorative Verhalten mit dem Offenfeldtest nachweisen (Pennanen et al., 2004). Weiterhin sind für dieses Tiermodell das Auftreten von motorischen Defiziten (Paraparesen) im höheren Lebensalter und eine verkürzte Lebensdauer mit durchschnittlicher Sterblichkeit nach 7 bis 12 Monaten beschrieben. Trotz der nachgewiesenen motorischen Defizite im höheren Lebensalter konnten bei diesen Tieren eine bessere Performance, d.h. eine bessere Balance auf dem Rota-ROD im jüngeren Alter von 5 Monaten beobachtet werden (Morgan et al., 2008).

Zusammenfassend zeigen die bisher durchgeführten Studien zu Tau-transgenen Tieren, dass eine Korrelation zwischen der Hyperphosphorylierung von Tau-Protein und der Beeinträchtigung der Gedächtnisfunktionen im Tiermodell besteht. Weiterhin ergeben sich durch einzelne Studien Hinweise für frontale Verhaltensänderungen, wie z.B. eine Disinhibition für das explorative Verhalten (Pennanen et al., 2004) und ein gesteigertes depressives Verhalten der Tiere (Egashira et al., 2005).

Nachfolgende Verhaltensstudien an transgenen Tiermodellen geben die Möglichkeit zu überprüfen, ob sich weitere klinische Auffälligkeiten der Tauopathien im Tiermodell reproduzieren lassen. Mit gut validierten Tiermodellen, die klinisch relevante Verhaltensdefizite in Korrelation zu den neuropathologischen Veränderungen aufweisen, können z.B. durch neuere therapeutische Ansätze wie Medikamente, Tiefenhirnstimulation, Zelltherapie oder Gentherapie wichtige Erkenntnisse hinsichtlich eines potentiellen Nutzens beim Menschen gewonnen werden.

1.4 Verhaltenstests

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Verhaltenstests eingesetzt:

Der Offenfeld-Test (OFT)

Das Grundprinzip des Offenfeld-Tests besteht darin, ein Tier mit einer ihm unbekannten Umgebung zu konfrontieren, aus der es nicht entkommen kann. Dabei werden verschiedene Verhaltensweisen des Tiers beobachtet. Die Durchführung variiert je nach Fragestellung im Aufbau der Testanlage (rund oder quadratisch), in der Beleuchtung oder durch die Anwesenheit von Objekten innerhalb der Arena (Prut und Belzung, 2003; Takahashi und Kalin, 1989). Auch die Dauer der Tests ist variabel, sie kann zwischen 2 und 60 Minuten betragen. Der Offenfeld-Test ist eine häufig verwendete Methode in der tierpsychologischen Forschung und wird unter anderem zur Erfassung von Ängstlichkeit und Neugierde von Tieren genutzt (Belzung, 1999). Hält ein Tier sich vermehrt im Zentrum einer definierten Arena, also nicht in der Nähe der Wand auf, gilt es als weniger ängstlich (Prut and Belzung, 2003). Außer der Ängstlichkeit der Tiere können auch verschiedene lokomotorische Parameter erfasst werden (Prut und Belzung, 2003), wie beispielsweise die zurückgelegte Strecke, die Geschwindigkeit und das Aufrichtverhalten („Rearing“) (Cools and Gingras, 1998; Thiel et al., 1999; Pawlak und Schwarting, 2002; Borta und Schwarting, 2005). Je mehr sich ein Tier in der Testarena bewegt, desto größer ist seine lokomotorische Aktivität oder sein Antrieb. Gleichzeitig korreliert die Lokomotion auch wiederum mit der Ängstlichkeit eines Tieres. Verhält sich ein Tier ängstlich, zeigt es infolge dessen auch weniger Aufrichtverhalten.

Mit diesem Test kann u.a. geprüft werden, ob ein transgenes Tiermodell eine Veränderung des Antriebs und/oder der Ängstlichkeit, ähnlich den FTDP-17-typischen Merkmalen (Antriebslosigkeit bis Antriebssteigerung, Disinhibition), aufweist.

Der Objektwiedererkennungstest (OWT)

Mit Hilfe des OWT ist es möglich das deklarative Gedächtnis (Erinnerung an Objekte) von Nagetieren zu testen, welches an die Funktion des Hippocampus gebunden ist (Hammond et al., 2004). Eingeführt wurde der Test erstmals 1988 von Ennaceur und Delacour (Ennaceur und Delacour, 1988). Die Grundlage des Verfahrens ist die natürliche Neugierde der Tiere für unbekannte Objekte, die sich auf Antriebe durch Beschnuppern, Berühren mit den Vorderpfoten oder Aufrichten auf ein Objekt äußert (Aggleton, 1985). Der Testablauf setzt sich aus zwei Phasen zusammen: in der ersten Phase macht sich das Tier mit einem Objekt vertraut (Familiarisierung), in der zweiten Phase überprüft man durch Präsentation eines bekannten und eines neuen Objektes die Gedächtnisfunktion. Ist diese intakt, wird sich das Tier durch seine natürliche Präferenz mehr mit dem neuen Objekt mehr als mit dem bekannten Objekt beschäftigen. Ein Vorteil dieses Tests gegenüber anderen Gedächtnistests ist die Nutzung des natürlichen, spontanen Verhaltens. Die Tiere benötigen im Vorfeld kein spezielles Training,

eine Belohnung oder Bestrafung der Tiere erfolgt nicht (Dere et al., 2007). Eine Beeinträchtigung der mnestischen Funktionen ist ein Symptom, welches im Verlauf der FTDP-17 auftritt. Mit dem OWT kann ein transgenes Tiermodell auf das Vorhandensein solcher Defizite überprüft werden.

Der Soziale-Interaktions-Test (SIT)

Der SIT wurde 1978 von File und Hyde (File and Hyde, 1978) entwickelt, ursprünglich mit dem Ziel, Ängste natürlicher Genese zu erzeugen, um natürliche Verhaltensweisen von Nagetieren erfassen zu können. Die wichtigste messbare Variable ist die Zeit, die Testpartner in sozialer Interaktion verbringen. Dabei beobachtet man Folgeverhalten, Beschnüffeln oder sich gegenseitiges Putzen. Während des Tests befinden sich die Tiere in einer neutralen Testumgebung, aus der sie nicht entkommen können. Ein weiterer messbarer Parameter ist die motorische Aktivität, die zur sozialen Interaktion ins Verhältnis gestellt werden kann. Steigt die soziale Interaktion im Verhältnis zur allgemeinen motorischen Aktivität an, ist dies ein Zeichen für Disinhibition (Enthemmung) der Testpartner. Dies konnte z.B. bei Läsionen des medialen prä-frontalen Kortex beobachtet werden (de Bruin et al., 1983). Einen großen Einfluss auf das Verhalten haben Faktoren wie Lichtbedingungen, Vertrautheit mit der Testarena und Haltungsbedingungen (Einzel- versus Gruppenhaltung). Helle Beleuchtung und eine fremde Umgebung erhöhen die Ängstlichkeit (File 2003), Einzelhaltung der Tiere erhöht die Zeit der sozialen Interaktion (Niesink und van Ree, 1982). Da sich die Testpartner im Verhalten gegenseitig beeinflussen, sollte man sie bei der Auswertung als eine Einheit und nicht als zwei Individuen betrachten.

Bei der FTDP-17 kommt es im Verlauf der Erkrankung schon früh zu einem abnormen Verhalten entweder durch Enthemmung der Betroffenen im sozialen Umgang (Disinhibition) oder durch eine Reduktion von zwischenmenschlichen Kontakten (sozialer Rückzug durch Antriebsmangel). Diese Beeinträchtigungen der sozialen Interaktion können mit dem SIT gut im Tiermodell erfasst werden.

Der Rota-ROD-Test (Rota-ROD)

Der Rota-ROD ist eine einfache Testmethode, mit der man motorische Funktionen von Nagetieren erfassen kann. Die Testapparatur besteht aus mehreren, voneinander getrennten Kammern, durch die eine rotierende Stange verläuft. Die Geschwindigkeit der Rotation lässt sich variieren und wird in Runden pro Minute angegeben (r/min). Die Geschwindigkeit kann während des Testes entweder gleich bleiben oder sich schrittweise steigern. Der Durchmesser der Stange variiert je nach Größe der zu testenden Tiere. Zur Erfassung der motorischen Geschicklichkeit wird die Zeit gemessen, die ein Tier auf der Stange balancieren kann. Diese wird durch Kontakt mit dem Boden der Testanlage automatisch gemessen, wenn das Tier von der Stange fällt. Dadurch ist es möglich motorische Defizite der Tiere aufzudecken (Nakagawa

et al., 1995; Bordet et al., 2001; Egashira et al., 2004) und sie somit auf FTDP-17-typische motorische Defizite hin (z.B. akinetisch-rigides Syndrom) zu überprüfen.

Der Forcierte-Schwimm-Test (FST)

Der FST wurde erstmals 1977 von Porsolt (Porsolt et al., 1977) als Methode zur Erfassung von depressivem Verhalten bei Nagetieren beschrieben. Die auch heute noch viel verwendete Testprozedur besteht darin, eine Maus für die Dauer von 6 Minuten in einen mit Wasser gefüllten Zylinder zu setzen, aus dem sie nicht entkommen kann. Der Parameter, der zur Erfassung depressiven Verhaltens verwendet wird, ist die Zeit der Bewegungslosigkeit („immobility time“), welche auch als „floating“ bezeichnet wird. Das Fluchtverhalten („struggling“, strampeln), das meist zu Beginn der Untersuchung zu beobachten ist, wird typischerweise im Verlauf aufgegeben und geht in das Schwimmverhalten („swimming“) über, bei dem zwar aktive Bewegungen ausgeführt werden, aber kein Fluchtverhalten mehr gezeigt wird. Dieses Verhalten geht anschließend meist in die Zeit der Bewegungslosigkeit über, in der nur minimale Bewegungen mit den Vorder- oder Hinterpfoten zu beobachten sind. Je schneller das „floating“ einsetzt und je größer sein Anteil an der Gesamttestzeit ist, als desto depressiver gilt das Tier. Eine Fehlerquelle kann jedoch entstehen, wenn durch motorische Defizite der Tiere auch die Fähigkeit zum Schwimmen und „Struggeln“ beeinflusst wird. Dadurch könnte ein falsch hoher Anteil an depressivem Verhalten gemessen werden. Zur korrekten Interpretation der Testergebnisse FST müssen daher immer die lokomotorischen Fähigkeiten eines Tieres miteingefasst werden. Das Testverfahren wird häufig genutzt, um die Wirkung von antidepressiv wirksamen Therapien zu erfassen, der Anteil des Floatings nimmt bei Wirksamkeit der Medikation ab (Petit-Demouliere et al., 2005).

Auch bei der FTDP-17 können depressive Affektveränderungen beobachtet werden, die mittels dieses Testes im Tiermodell erfasst werden können.

1.5 Ziel der Arbeit

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist, zwei transgene Mausmodelle (RW, hWT) im Vergleich zu einer nicht-transgenen Kontrollgruppe (Wildtyp, WT) auf das Vorhandensein von FTDP-17-typischen Verhaltensauffälligkeiten zu untersuchen. Es wurden zwei verschiedene transgene Mausmodelle hWT (humanes Wildtyp-Tau) und RW (humanes Tau mit R406W-Mutation) untersucht. Die Gruppe hWT exprimiert die längste der sechs bekannten Tau-Isoformen (4R; 2N-Tau). Das zweite der untersuchten Modelle exprimiert diese Isoform mit einer zusätzlich eingefügten Punktmutation R406W in Exon 13. Wie bereits beschrieben, wurden die Transgene unter der Kontrolle des pan-neuronalen Maus-Prion-Protein-Promotors (MoPrP.Xho) exprimiert. Alle untersuchten Tiere entstammen einem B6C3 Hintergrund (Zhang et al., 2004).

Eine erste Kontrollgruppe aus nicht-transgenen Geschwistertieren (WT) wurde untersucht, um die Normalwerte der Testprozedur für Mäuse dieses genetischen Hintergrundes zu erheben. Die zweite Kontrollgruppe aus hWT-Tieren wurde untersucht, um zu sehen, welche Verhaltensauffälligkeiten alleine durch die Anwesenheit von „normalem“ humanen Tau ohne FTDP-17-Mutation im Gehirn von Mäusen erklärt werden. Die RW-Tiere schließlich wurden als Modell der FTDP-17 studiert.

In einer 2004 durchgeführten Untersuchung von Zhang und Kollegen ist es gelungen, im Hippocampus der RW-Tiere (gleicher Promotor und genetischer Hintergrund) Veränderungen nachzuweisen, die denen im Hippocampus von FTDP-17 Patienten mit R406W-Mutation ähneln (siehe Abbildung 6, Zhang et al., 2004). Mit der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich auch auf der Verhaltensebene ähnliche Defizite bei den transgenen Tieren zeigen wie bei den FTDP-17 Patienten. Mit Hilfe einer Testbatterie, aus fünf verschiedenen Verhaltenstests (OFT, OWT, SIT, Rota-ROD und FST) sollen Verhaltensunterschiede im Tiermodell, insbesondere kognitive, affektive, soziale und motorische Funktionen erfasst werden. Die Ergebnisse der Arbeit sollen Aufschluss darüber geben, ob die untersuchten Mausmodelle phenotypische Merkmale einer FTDP-17 wie beispielsweise enthemmtes Verhalten oder Ablehnung von sozialen Kontakten, gesteigerte Lokomotion, Gedächtnisdefizite, extrapyramidale Symptome oder depressives Verhalten präsentieren. In einen Beobachtungszeitraum von 58 Wochen sollen durch Wiederholung der Testprozeduren auch der zeitliche Verlauf von Verhaltensunterschieden erfasst werden. Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen durch die einzelnen Verhaltenstests beantwortet werden:

- Zeigen die transgenen Tiermodelle im OFT Auffälligkeiten in der lokomotorischen Aktivität (Hyperaktivität oder erniedrigte Aktivität durch Akinese oder Hinweise auf ängstliches Verhalten)?
- Weisen die transgenen Tiermodelle Defizite des deklarativen Gedächtnisses auf die mit dem OWT erfasst werden können?
- Zeigen sich Unterschiede in der Kontaktzeit zwischen transgenen- und nicht-transgenen Tieren im SIT als Ausdruck eines veränderten sozialen Verhaltens durch entweder enthemmtes Verhalten oder Ablehnung von sozialen Kontakten?
- Weisen die transgenen Tiermodelle motorische Defizite auf, die Rückschlüsse auf mögliche lokomotorische Defizite durch den Rota-ROD geben können?
- Zeigen die transgenen Mausmodelle erhöhte Werte für den Parameter „Floating“ im FST als Ausdruck einer gesteigerten depressiven Affektlage?
- In welchem Alter sind die ersten Auffälligkeiten zu erkennen und wie ist deren Progredienz?

Eine Beantwortung dieser Fragen könnte darüber Aufschluss geben, ob die untersuchten transgenen Tiermodelle nicht nur histologisch sondern auch auf Verhaltensebene die Pathologien der FTDP-17 widerspiegeln und so die Möglichkeit geschaffen werden könnte diese Auffälligkeiten in Zukunft zur Testung neuer Therapieverfahren zu nutzen.

2 Material und Methoden

Für die Durchführung der Tierversuche lag die Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen vor (Ordnungsnummer 45/2007).

2.1 Körpergewicht

Um das Körpergewicht der Tiere während des gesamten Testzeitraumes dokumentieren zu können, wurden alle Tiere ein Mal pro Testdurchgang, jeweils zum Zeitpunkt des Rota-ROD, gewogen.

2.2 Transgene Mausmodelle

Die transgenen Tiere wurden von Frau Prof. Virginia M. Lee am Center for Neurodegenerative Disease Research, Department of Pathology and Laboratory Medicine, and Institute on Aging, The University of Pennsylvania, School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania generiert. Wir haben Zuchtpärchen erhalten und bauten eine eigene Zucht in der geschlossenen Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Philipps Universität Marburg auf. Der genetische Hintergrund der Tiere wurde im Kapitel Einleitung beschrieben. Nur Mäuse mit männlichem Geschlecht wurden in die Versuchsgruppen integriert. Die Bestimmung des Genotyps (RW, hWT, WT) erfolgte erstmals im Alter von vier Wochen anhand von Proben der Maus-Ohren durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) und wurde post mortem durch Proben des Maus-Schwanzes erneut durch die PCR verifiziert, um die Gefahr von Verwechselungen zu reduzieren.

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR besteht aus der Vermehrung definierter DNA-Sequenzen durch spezifische thermostabile DNA-Polymerasen. Es wurden folgende PCR-Ansätze verwendet:

Reagenz	Menge
H ₂ O	14,4 µl
Puffer S	2,5 µl
dNTPs (2mM)	2,5 µl
TAU K2B	2,0 µl
TAU 12B	2,0 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA-Lösung	1,5 µl

Tab. 3: Zusammensetzung der PCR-Ansätze mit Angabe der verwendeten Reagenzien und der jeweiligen Mengen. dNTPs: Desoxy-Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Primer: (TAU K2B (GGT TTT TGC TGG AAT CCT GG) und TAU 12B (GGA GTT CGA AGT GAT GGA AG)), DNA-Lösung (Maus-Ohr bzw. -schwanz).

Folgende PCR-Programme wurden durchlaufen:

Primer	TAU K2B	TAU 12B
Initiale Denaturierung	3 Minuten bei 95°C	3 Minuten bei 95°C
Denaturierung	1 Minute bei 95°C	1 Minute bei 95°C
Annealing	1 Minute bei 60°C	1 Minute bei 60°C
Elongation	3 Minuten bei 72°C	3 Minuten bei 72°C
Anzahl Zyklen	34	34
Inkubation	10 Minuten bei 72°C	10 Minuten bei 72°C
Abkühlung	bei 4°C	bei 4°C

Tab. 4: PCR-Programme.

2.4 Haltungsbedingungen

Alle Tiere wurden in der geschlossenen Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums geboren. Im Alter von sieben Wochen trennten wir die Mäuse von den Zuchttieren und brachten sie im Tierstall der offenen Tierhaltung unter. Die Beleuchtung des offenen Tierstalles erfolgte nach einem Hell/Dunkel-Rhythmus im Verhältnis 12:12 Stunden, wobei die Lichtphasen zwischen 6:00 Uhr und 18:00 Uhr und die Nachtphasen von 18:00 Uhr bis 6:00 Uhr stattfanden.

Die Raumtemperatur betrug 22°C. Alle Tiere, die an den durchgeführten Versuchen beteiligt waren, wurden in Gruppen gehalten, wobei sich maximal vier Geschwistertiere in einem Käfig (Fa. Ehret GmbH & Co. KG) befanden. Um Stress für die Tiere während der Tests möglichst gering zu halten, wurde die Versorgung der Tiere (Reinigen und Wechseln der Käfige, Auffüllen von Wasser und Futter) durch den Experimentator ausgeführt. Die Käfige mit Gitterdeckeln wurden ein Mal pro Woche gewechselt und neu eingestreut. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Teklad Global Diet). Nachdem wir die Tiere aus der geschlossenen in die offene Tierhaltung überführt hatten, warteten wir eine Woche bis zum Beginn der Verhaltensexperimente, damit die Mäuse sich an die neuen Haltungsbedingungen (Trennung vom Muttertier und Gruppenhaltung mit Geschwistertieren) gewöhnen konnten.

2.5 Übersicht über die Experimente

Zur Untersuchung von Verhaltensunterschieden führten wir Verhaltenstests beginnend in der 6. Lebenswoche über einen Zeitraum von 58 Wochen durch. Wir verwendeten eine Testbatterie, die aus fünf unterschiedlichen Testarten bestand (OFT, OWT, SIT, Rota-ROD und FST). Die gesamte Testbatterie wurde insgesamt zu fünf Zeitpunkten in gleicher Reihenfolge durchgeführt. Abb. 7 zeigt den zeitlichen Ablauf der Experimente. Aufgrund technischer Limitationen konnten nicht immer alle Tiere zu allen Zeitpunkten die Tests durchlaufen. Aufgrund der Durchführung von begleitenden histologischen Untersuchungen (nicht Bestandteil dieser Arbeit) kam es im Verlauf ebenfalls zu einer stetigen Reduktion der Gruppengrößen. Während der gesamten Dauer der Versuche sind drei Tiere spontan gestorben (RW: N=3; hWT: N=0; WT: N=0).

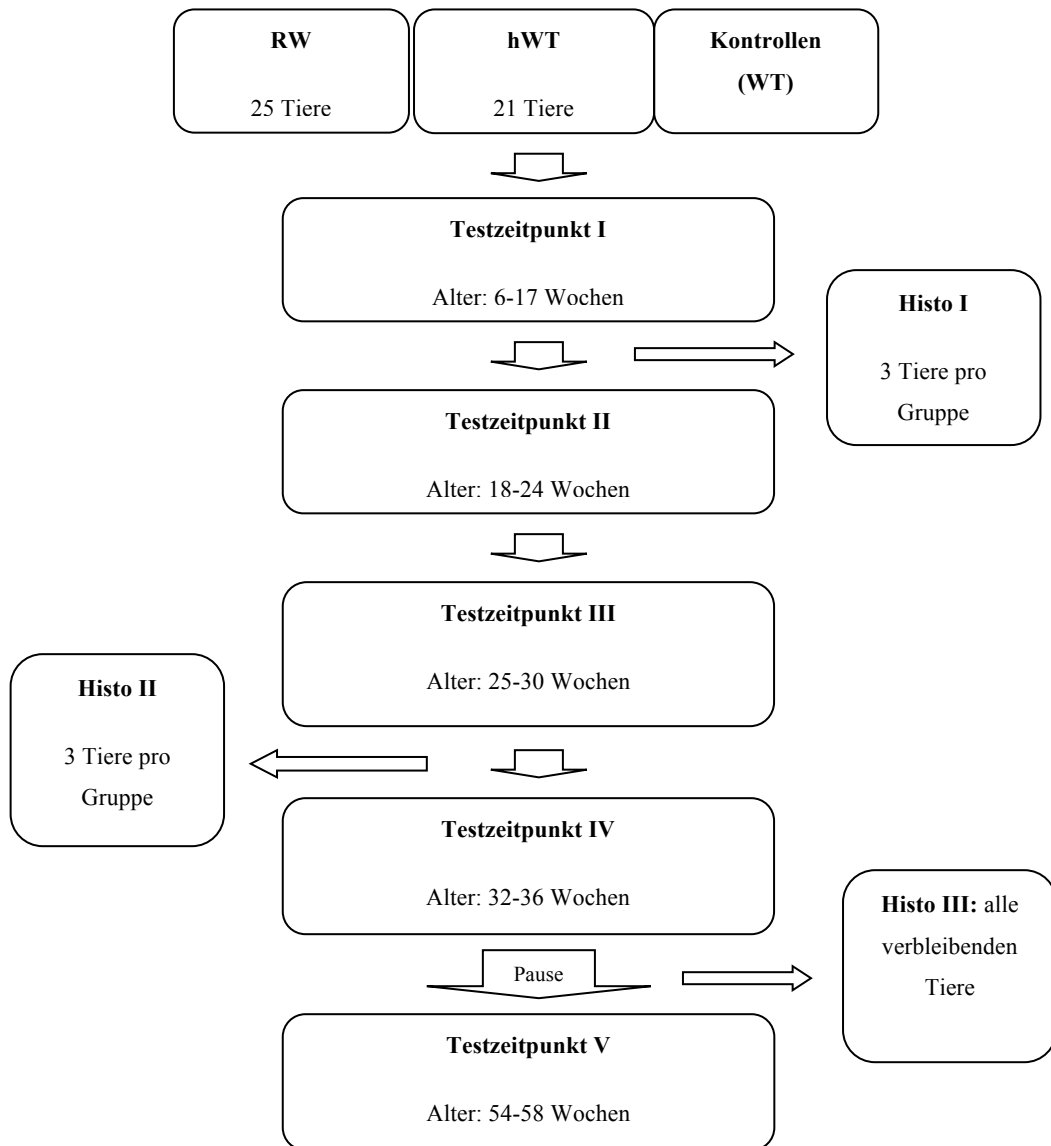


Abb. 7: Zeitliche Übersicht über die Experimente im Flussdiagramm. In jedem Testdurchgang wurden jeweils die Tests OFT, OWT, Rota-ROD, FST und SIT durchgeführt. Histo I-III: Zeitpunkte der Gruppenreduktion zur histologischen Untersuchung von zufällig gewählten Tieren. WT: Wildtyp-Mäuse; RW: Mäuse, welche humanes Tau mit R406W Mutation überexprimieren; hWT: Mäuse, welche humanes Wildtyp-Tau überexprimieren.

2.6 Generelle Versuchsdurchführung

Jeder Versuch wurde innerhalb der Hellphase des Tag/Nacht-Zyklus durchgeführt. Die Käfige wurden einzeln vom Versuchsleiter in das Verhaltenslabor gebracht und bis zum Beginn der Tests auf dem Labortisch platziert. Eine Messung des Gewichtes der Tiere erfolgte am Tag der Durchführung des Rota-Rod. Der OFT, der OWT und der SIT wurden bei einer Beleuchtungsstärke von 2-3 Lux durchgeführt, die vor Beginn der Tests mit Hilfe eines digitalen Luxmeters (MS-1500, Fa. Conrad Electronic GmbH, Hirschau, Deutschland) im Zentrum jeder Arena ermittelt wurde. Der Experimentator platzierte die Tiere per Hand in die Testapparatur und setzte sie nach Abschluss des Experiments wieder in ihre Heimatkäfige zurück. Alle Testapparaturen wurden vor Beginn und nach Beendigung der Tests mit 0,1% Essigsäure ausgesprüht und anschließend mit Papiertüchern gereinigt, um Ausscheidungsrückstände und Duftmarken der vorangegangenen Tiere zu entfernen und somit die Testbedingungen anzugleichen. Die zu erfassenden Verhaltensparameter aller Tests mit Ausnahme des Rota-ROD wurden durch eine Kamera (VIDEO, B/W CCD CAMERA, Sony, Guangdong, China) und mit der Software Viewer II (Fa. Biobserve, Bonn, Deutschland) erfasst und ausgewertet.

2.7 Verhaltenstests

OFT

Die Testapparatur (Hersteller Peter Muth-Feinmechanik, Marburg, Deutschland) bestand aus einer Grundplatte der Größe 1230 x 1080 mm, die in 4 Arenen (50 x 50 x 40 cm) unterteilt war. Der Boden jeder Arena bestand aus einer einschiebbaren Bodenplatte aus Metall der Größe 50 x 50 cm. Die Höhe der vier Wände betrug 40 cm. Sie wurden aus weißem undurchsichtigen Kunststoff gefertigt. Über der Testanlage befanden sich die Kamerahalterung sowie die Beleuchtungsanlage, die aus einer Streulichtscheibe und acht darüber angebrachten Lampen (C25W) bestand um eine indirekte Beleuchtung mit 2-3 Lux zu erzeugen. Die Kamera (VIDEO, B/W CCD CAMERA, Sony, Guangdong, China) befand sich in der Mitte der Streulichtscheibe über der Testapparatur. Der Kamera-Boden-Abstand betrug ca. 1,5 m.



Abb. 8: Rechts: Offenfeldtest-Anlage mit Blick von oben (Kameraperspektive) und von vorne (Experimentatorperspektive, linkes Bild).

Jede Maus wurde pro Testdurchgang für 30 Minuten in die Arena eingesetzt. Es wurden jeweils Tiere der gleichen Gruppe in einem Versuch getestet. Mittels Videokamera und der Software Viewer II (Fa. Biobserve, Bonn, Deutschland) wurden die Verhaltensparameter ermittelt. Die Software ermöglichte eine online Verhaltensauswertung der Tiere in der Offenfeld-Arena. Das Verhalten wird mittels der Videokamera erfasst und über einen Wandler (ADVC-50, Fa. Canopus, Kobe, Japan) in den Computer (AMD-Athlon 64 3200+ CPU FSB 1000, 1 GB RAM, AMD, Sunnyvale, USA) eingespeist. Folgende Verhaltensweisen wurden dabei erfasst:

- Track-Länge: Gesamtstrecke in cm, die ein Tier innerhalb von 30 Minuten zurückgelegt hat
- Mittlere Geschwindigkeit: durchschnittliche Geschwindigkeit eines Tieres während des 30-minütigen Tests
- Aktivität: Bewegungsänderung > 4 cm/Sekunde eines Tieres pro 30 Minuten Test-Zeit

OWT

Der OWT wurde ebenfalls in der oben beschriebenen Testapparatur durchgeführt. Die Arenen sowie die verwendeten Objekte wurden vor Testbeginn und nach der Habituationsphase mit 0,1% Essigsäure gereinigt. Die Testprozedur setzte sich aus den folgenden drei Phasen zusammen:

- Habituationsphase: fünf Minuten freie Explorationszeit zur Gewöhnung der Tiere an die Umgebung
- Familiarisierungsphase: fünf Minuten Familiarisierung mit 2 identischen Objekten (entweder Glas oder Metall)

- Testphase: fünf Minuten Exploration des bekannten und eines neuen Objektes, das aus dem bisher nicht präsentierten Objekt bestand (Glas oder Metall)



Abb. 9 zeigt die im Test verwendeten Objekte: Metallobjekt (links) und Glasobjekt (rechts).

Die Habituations- und die Gewöhnungsphase fanden an einem Tag unmittelbar nacheinander statt, die Testphase wurde am darauf folgenden Tag durchgeführt. Als Objekte (siehe Abbildung 8) verwendeten wir anthrazitfarbene Kegel aus Metall (Höhe 6,5 cm, oberer Durchmesser 3,5 cm, unterer 4 cm) und Glasobjekte (Höhe 2,5 cm, unterer Durchmesser 7,5 cm, oberer 4,5 cm). Sie wurden mit Hilfe Schablone einer aus Plastik (Fa. Muth-Feinmechanik, Marburg, Deutschland) stets an die gleichen Stellen innerhalb der Arenen platziert. Wir teilten die Versuchstiere für die Familiarisierungsphase in 2 Gruppen ein; die Hälfte der Tiere erhielt das Objekt Glas, die andere Hälfte erhielt das Metallobjekt. In jeder Arena wurden jeweils ein Glas- und ein Metallobjekt platziert. Nach dem Einsetzen der Tiere wurde der Test gestartet. Mit Hilfe des Computerprogramms Viewer II konnte die Kontaktzeit der Tiere mit den Objekten ermittelt werden. Dazu wurden die Arenen mittels Software am Bildschirm in Zonen unterteilt. Diese waren kreisförmig angelegt und ihr Durchmesser betrug 1 cm mehr als der Durchmesser der verwendeten Objekte. Ein Kontakt wurde detektiert, wenn sich ein Tier in der Zone um ein Objekt aufhielt. Die folgenden Parameter wurden dabei erfasst und statistisch ausgewertet:

- Zeit der Exploration (Erkundung) des bekannten Objektes
- Zeit der Exploration des neuen Objektes
- Anzahl der Besuche des bekannten Objektes
- Anzahl der Besuche des neuen Objektes

SIT

Alle Tests wurden mit der Testanlage des oben bereits beschriebenen OFT durchgeführt. Da alle Tiere bereits vor dem SIT den OFT und den OWT absolviert hatten, waren sie bereits an die Arenen gewöhnt, weshalb der SIT direkt und ohne vorherige Habituationsphase (Vertrautmachen der einzelnen Tiere mit der Testumgebung) durchgeführt werden konnte. Um die Zuordnung zu den Gruppen (transgene Tiere und Kontroll-Tiere) zu erleichtern wurden die Schwänze der Kontrollmäuse farblich gekennzeichnet. Die Testpaare bestanden bei allen Tests jeweils aus einer transgenen (hWT oder RW) und einer Kontrollmaus (WT). Der Versuch unterlag einem festen Ablauf. Das Einsetzen der Kontrolltiere erfolgte zuerst, die transgenen Tiere wurden unmittelbar danach eingesetzt. Die Testzeit betrug 30 Minuten. Erfasst wurden folgende Parameter der sozialen Interaktion:

- Kontaktzeit: Gesamtdauer (in Sekunden) der Kontakte zwischen den Testpartnern pro 30 min Testzeit
- Anzahl der Kontakte: Anzahl der einzelnen Kontakte der Testpartner pro 30 min Testdauer

Die Auswertung wurde anhand der aufgenommenen Filme durch das Programm Viewer II durchgeführt. Anhand des Verlaufes der Körperachse konnte der Mittelpunkt der Tiere aber auch die Lokalisation von Nase und Schwanz ermittelt werden. Dadurch gelang es zwischen einem realen Kontakt (Nase zu Schwanz, Nase zu Körper, Nase zu Nase) und einem nur flüchtigem Passieren in der Testarena zu unterscheiden. Die Definition eines Kontaktes wurde weiterhin durch den Abstand der Tiere zueinander (maximaler Abstand von 10 Pixeln) und durch die Dauer des einzelnen Kontaktes (minimal 10 Millisekunden) definiert.

Rota-ROD

Um die motorischen Funktionen der Mäuse zu testen, verwendeten wir einen 4-Kammer Rota-ROD-Apparat (3376-4R, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Die Tiere wurden vom Versuchsleiter einzeln auf eine Stange gesetzt, die mit einer Geschwindigkeit von 10 r/min (Runden pro Minute) rotierte. Der Durchmesser der Stange betrug 30 mm. Jedes Tier hatte 4 Versuche, um maximal 120 Sekunden auf der Stange zu balancieren. Erfasst und statistisch ausgewertet wurde die Anzahl der Versuche, die das Tier benötigte und die maximal erreichte Zeit, die das Tier auf dem Rota-ROD balancieren konnte.

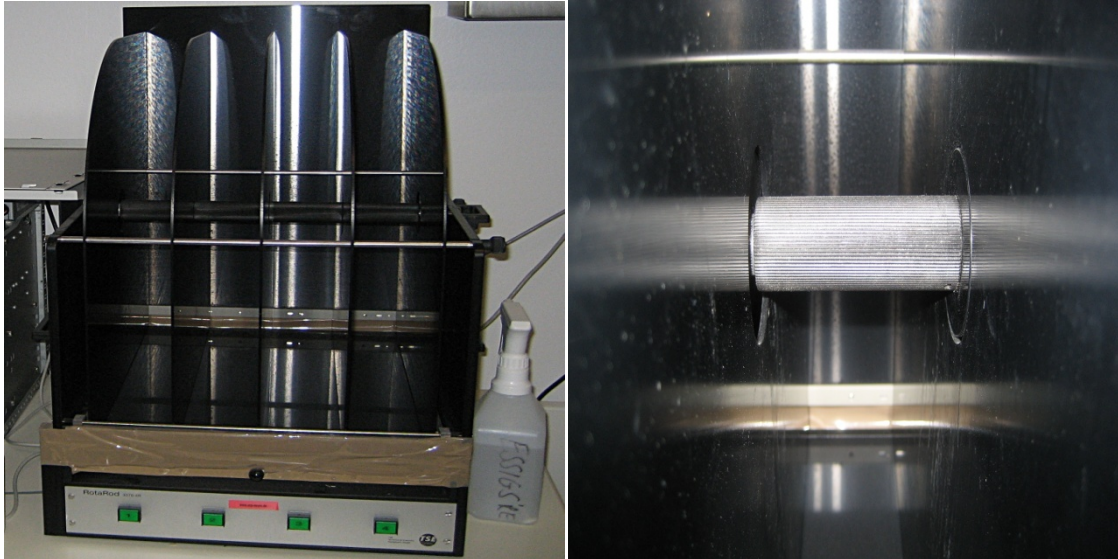


Abb. 10: Vier-Kammer-Rota-ROD-Apparat: Ansicht von vorne (links) und Detailansicht einer Kammer (rechts)

FST

Alle FST wurden tagsüber zwischen 9:00 Uhr und 20:00 Uhr durchgeführt, um eine mögliche Verfälschung durch den zirkadianen Rhythmus der Tiere zu vermeiden. Die Testapparatur (Peter Muth-Feinmechanik, Marburg, Deutschland) bestand aus vier nach vorne und oben offenen rechteckigen Kammern. Die Wände waren aus weißem intransparenten Plastikmaterial gefertigt. In die Kammern wurde jeweils ein Testbehälter eingefügt. Es wurden Glaszylinder (Modell DURAN, Fa. Schott AG, Mainz, Deutschland) mit einem Durchmesser von 14,5 cm und einer Höhe von 14,5 cm verwendet. Die Wassertiefe betrug 11 cm und die Wassertemperatur $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Die Raumtemperatur wurde an die Wassertemperatur angeglichen, um eine Auskühlung der Tiere nach dem Test zu verhindern. Die Zylinder wurden vor jedem Durchgang mit frischem Wasser gefüllt, um Ausscheidungsrückstände und Duftmarken der zuvor getesteten Tiere zu entfernen. Bei jedem Testdurchgang wurden maximal vier Tiere (ein Tier pro Glaszylinder) für eine Dauer von 6 Minuten getestet. Nach Beendigung des Tests wurden die Tiere vom Versuchsleiter aus dem Wasser genommen, mit einem Papiertuch abgetupft und für 6 Minuten zum Trocknen in einen mit Streu gefüllten Käfig (Fa. Ehret GmbH und Co KG, Emmendingen, Deutschland) gesetzt, über dem eine Infrarotlampe (Infraphil R95E 100W Rubin f. Therapie, Fa. Philips, Amsterdam, Niederlande) angebracht war.

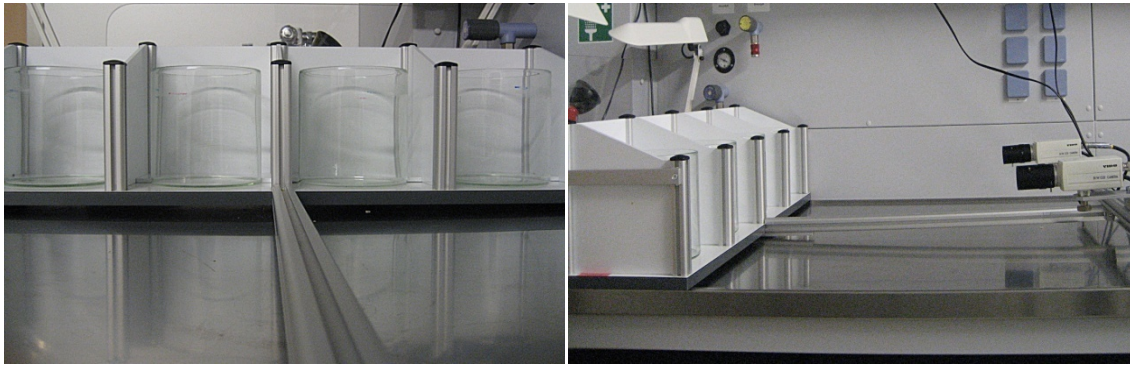


Abb. 11: Testanlage des Forcierten-Schwimm-Tests mit Ansicht aus der Kameraperspektive (links) und von seitlich (rechts).

Die Erfassung des Verhaltens erfolgte über 2 Kameras (VIDEO, B/W CCD CAMERA, Sony, Guangdong, China), die mit dem Rechensystem in Verbindung standen. Detektiert wurden automatisiert drei verschiedene Verhaltensweisen:

- Struggling: aktive Bewegungen der Vorder- und Hinterpfoten (prozentualer Anteil dieses Bewegungszustands an der Gesamttestzeit)
- Swimming: regelmäßige Bewegungen der Vorder- und Hinterpfoten (prozentualer Anteil dieses Bewegungszustands an der Gesamttestzeit)
- Floating: Immobilitäts-Zeit, Bewegungslosigkeit der Tiere im (prozentualer Anteil dieses Bewegungszustands an der Gesamttestzeit)

Alle aufgenommenen Daten wurden als Videofile im „DivX-Format“ auf den Rechnern gespeichert und konnten auf Wunsch reanalysiert werden.

2.8 Vollautomatisierte Verhaltensanalyse

Alle Tests, mit Ausnahme des Rota-ROD wurden mit den Programmen Viewer II und High Throughput Forced Swim Test Analysis durchgeführt. Die Software der Fa. Biobserve ermöglicht eine online Verhaltenserfassung der Tiere in der OFT-Arena oder in anderen Umgebungen. Das Verhalten wird dabei mittels Videokameras erfasst, die über oder vor der jeweiligen Testanlage angebracht sind. Durch den Wandler ist es möglich, das analoge Kamerasignal in ein digitales Videosignal zu überführen. Die temporäre Auflösung der Bilder betrug bis zu 25 Hz. Viewer II bestimmte über die Kontrast-Filter-Methode die Position eines Tieres innerhalb einer Testarena. Zusätzlich wird die Körperachse des Tieres durch Erkennung von Mittelpunkt, Kopf und Schwanz erfasst. Dadurch ist es möglich die zurückgelegte Strecke eines Tieres für die Gesamtdauer eines Tests automatisch zu detektieren, die Geschwindigkeit, mit der sich das Tier fortbewegt hat und über die Definition von Zonen die Aufenthaltszeit in bestimmten Abschnitten der Arena (Zentrum oder Peripherie) zu bestimmen.

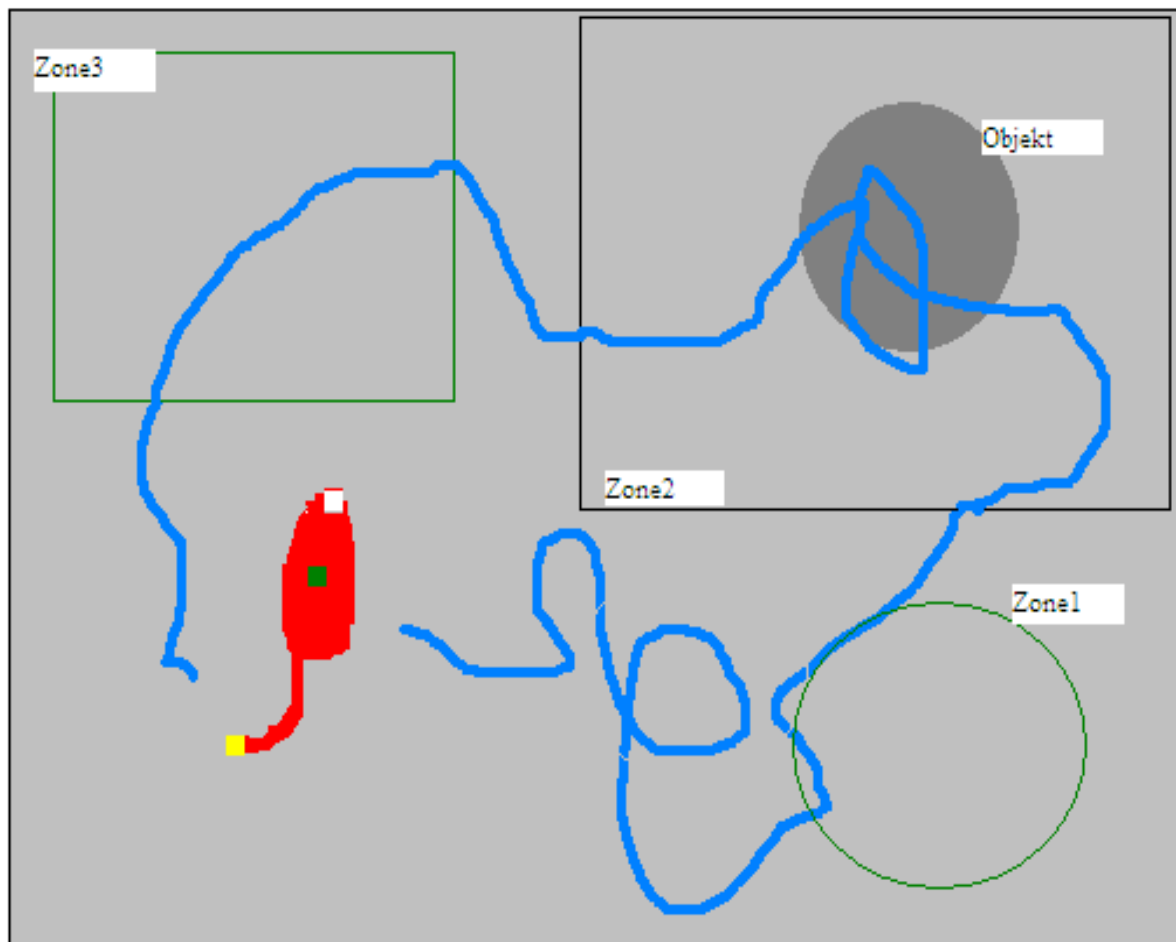


Abb. 12: Schematische Darstellung einer Arena im Offenfeld-Test mit Tierdetektion (Nase weiß, Körper grün und Schwanz gelb), Track-Länge (blau) und Zonenbeispielen

Die von uns für den FST verwendete Software analysierte die Video Bilder simultan für vier Tiere. Dabei wurden zwei Mäuse von jeweils einer Kamera erfasst. Die Auswertung der Verhaltensweisen Struggling, Swimming und Floating erfolgte online. Auch bei den anderen Tests (OFT, OWT und SIT) erschienen unmittelbar nach der Aufnahme der Bilder die analysierten Daten auf dem Computerbildschirm. Diese konnten anhand von gespeicherten Filmen (Format DivX 6.3) später erneut analysiert werden. Die Rohdaten wurden in Form von Tabellen oder Graphiken präsentiert und konnten automatisch in MS-Excel exportiert werden (Schwarz et. al., 2002).

2.9 Statistik

Alle statistischen Analysen der Verhaltensdaten wurden mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt. Vergleiche zwischen den Gruppen (WT, hWT und RW) sowie zwischen den Testzeitpunkten (Zeitpunkte I bis V) erfolgten mittels 2-way-ANOVA sowie durch den Post-Hoc-LSD-Test. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardfehler (SEM) dargestellt.

Wenn die ANOVA einen signifikanten Effekt des Genotyps zeigte, so wurde eine post hoc Analyse mittels LSD-Test nur zur Identifikation der signifikanten Unterschiede zwischen den drei Genotypen ohne Beachtung des Zeitpunktes durchgeführt. Wenn die ANOVA einen signifikanten Effekt des Zeitpunktes zeigte, so wurde eine post hoc Analyse mittels LSD-Test nur zur Identifikation der signifikanten Unterschiede zwischen den fünf Zeitpunkten ohne Beachtung des Genotyps durchgeführt. Wenn die ANOVA einen signifikanten Effekt der Interaktion des Genotyps mit dem Zeitpunkt zeigte, so wurde eine post hoc Analyse mittels LSD-Test zur Identifikation der signifikanten Unterschiede zwischen den 15 experimentellen Bedingungen (definiert durch die fünf Zeitpunkte und die drei Genotypen) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht

Die Entwicklung des Körpergewichts der drei experimentellen Gruppen im Zeitverlauf ist in Tab. 5 und in Abb. 14 dargestellt. In der 2-Way-ANOVA zeigte sich ein signifikanter Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,001$) sowie eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp x Alter ($p < 0,05$). Der post hoc LSD Test zeigte für jedes Alter ein signifikant geringeres Körpergewicht der RW-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren ($p < 0,001$) und zu den hWT-Tieren ($p < 0,001$). Zu keinem Zeitpunkt konnten signifikante Differenzen zwischen den Gruppen WT und hWT nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich eine signifikante Gewichtszunahme für die Tiere aller Genotypen für jeden Zeitpunkt ab Zeitpunkt II im Vergleich zu Zeitpunkt I ($p < 0,05$).

	I	II	III	IV	V
WT	32,71±0,36 (16)	35,03±0,79 (24) [#]	37,69±0,87 (24) [#]	42,10±0,60 (20) [#]	43,44±0,99 (10) [#]
hWT	31,48±0,72 (21)	34,91±0,97 (18) [#]	37,06±1,02 (18) [#]	41,17±1,31 (14) [#]	40,74±1,29 (10) [#]
RW	25,99±0,40 (23) [*]	28,02±0,50 (19) ^{*#}	28,81±0,40 (16) ^{*#}	30,46±0,53 (16) ^{*#}	31,65±0,72 (10) ^{*#}

Tab. 5: Mittelwerte ± SEM des Körpergewichts (Gramm) der Tiere der drei Genotypen für die fünf Alterszeitpunkte. Die Anzahl der untersuchten Tiere ist jeweils in Klammern dargestellt. ^{*} $p \leq 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe; [#] $p \leq 0,05$ vs. Zeitpunkt I desselben Genotyps; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

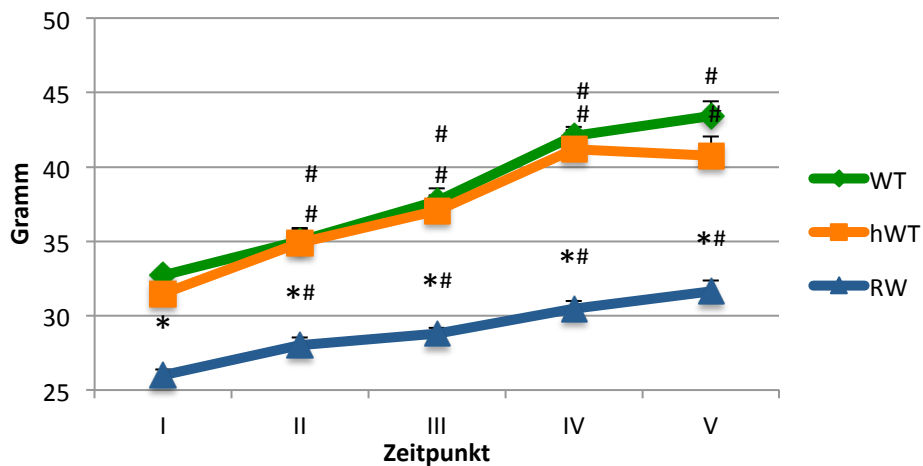


Abb. 14: Graphische Darstellung des mittleren Gewichts \pm SEM der Tiere zu den fünf Testzeitpunkten (siehe auch Tab. 5). * $p \leq 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe. # $p \leq 0,05$ vs. Zeitpunkt I desselben Genotyps; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

3.2 Rota-ROD

Anzahl der Versuche

In der 2-Way-ANOVA zeigte sich für die Anzahl der Versuche auf dem ROD (Tab. 6, Abb. 15, 16 und 17) ein signifikanter Effekt des Genotyps ($p < 0,01$) und des Alters ($p < 0,05$). Eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp x Alter zeigte sich nicht. Der post hoc LSD Test zeigte eine signifikant kleinere Anzahl von Rota-ROD Versuchen bei den RW-Tieren im Vergleich zu den hWT-Tieren und den WT-Tieren (jeweils $p < 0,01$). Bezüglich des Alters zeigte der post hoc LSD Test eine signifikant kleinere Anzahl der Versuche zu den Zeitpunkten III und IV im Vergleich zu den Zeitpunkten I und II (jeweils $p < 0,05$).

	I	II	III	IV	V
WT	2,42 \pm 0,31 (24)	2,46 \pm 0,29 (24)	2,00 \pm 0,28 (24)	2,00 \pm 0,31 (18)	2,30 \pm 0,42 (10)
hWT	2,62 \pm 0,33 (21)	2,39 \pm 0,30 (18)	1,78 \pm 0,26 (18)	1,86 \pm 0,31 (14)	2,70 \pm 0,42 (10)
RW	1,74 \pm 0,25 (23)	2,26 \pm 0,28 (19)	1,53 \pm 0,23 (19)	1,19 \pm 0,19 (16)	1,40 \pm 0,22 (10)

Tab. 6: Darstellung von Mittelwerten \pm SEM der Anzahl der Versuche der drei Genotypen für die Testzeitpunkte I-V. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Durchgang ist jeweils in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

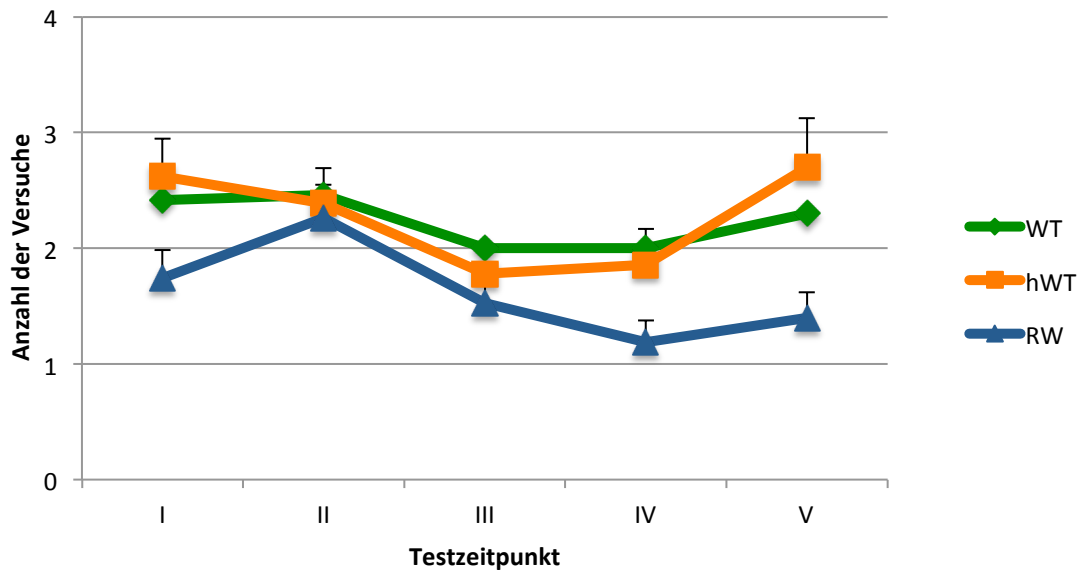


Abb. 15: Graphische Darstellung der mittleren Anzahl der Versuche \pm SEM der drei Genotypen zu den fünf Testzeitpunkten. Da die Interaktion zwischen Genotyp \times Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

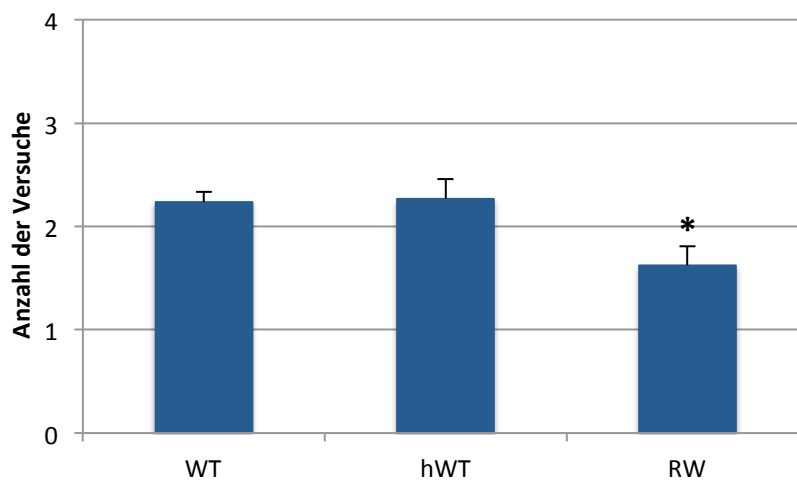


Abb. 16: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Anzahl der Versuch der Tiere der verschiedenen Genotypen auf dem Rota-ROD (alle fünf Alterszeitpunkte gemittelt). * $p < 0,01$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

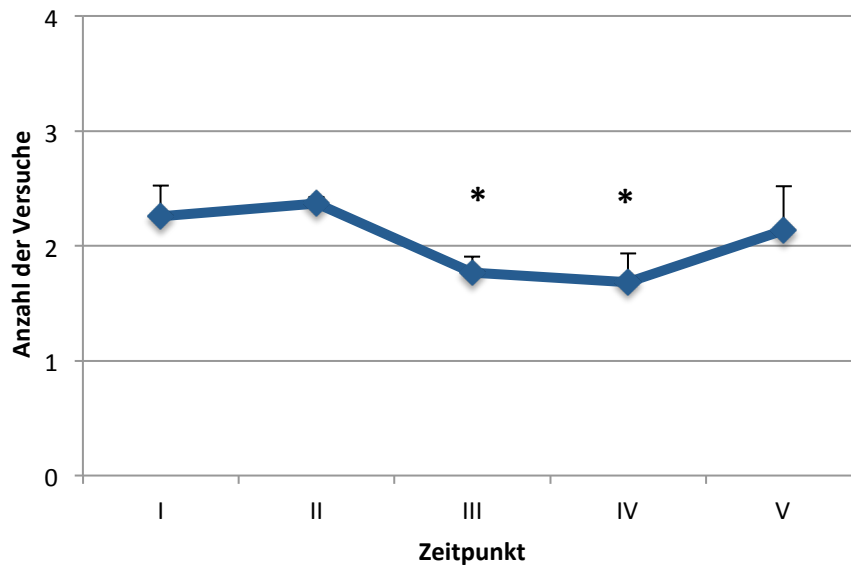


Abb. 17: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Anzahl der Versuche auf dem Rota-ROD für die fünf Alterszeitpunkte (Tiere aller Genotypen gemittelt). * $p < 0,05$ Zeitpunkte III und IV vs. Zeitpunkte I und II; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Zeit

In der 2-Way-ANOVA zeigte sich für die Zeit auf dem Rota-ROD (Tab. 7, Abb. 18, 19 und 20) ein signifikanter Effekt des Genotyps ($p < 0,01$) und des Alters ($p < 0,01$). Eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp \times Alter konnte nicht gezeigt werden. Der post hoc LSD Test zeigte eine signifikant längere Zeit auf dem Rota-ROD bei den RW-Tieren im Vergleich zu den hWT-Tieren ($p < 0,05$) und den WT-Tieren ($p < 0,01$). Bezüglich des Alters zeigten sich signifikante Unterschiede von Zeitpunkt II, III und IV im Vergleich zu Zeitpunkt I ($p < 0,05$).

	I	II	III	IV	V
WT	80,99 \pm 10,11 (24)	93,49 \pm 9,21 (24)	96,75 \pm 8,96 (24)	101,18 \pm 9,47 (18)	92,38 \pm 14,45 (10)
hWT	68,01 \pm 12,24 (21)	102,98 \pm 8,36 (18)	108,40 \pm 7,31 (18)	112,13 \pm 7,87 (14)	80,28 \pm 16,95 (10)
RW	101,31 \pm 8,72 (23)	103,88 \pm 8,40 (19)	108,67 \pm 7,78 (19)	120,00 \pm 0,00 (16)	120,00 \pm 0,00 (10)

Tab. 7: Darstellung von Mittelwerten \pm SEM der Zeit auf dem Rota-ROD für die Testzeitpunkte I-V. Die Anzahl der getesteten Tiere pro Durchgang ist jeweils in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp \times Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

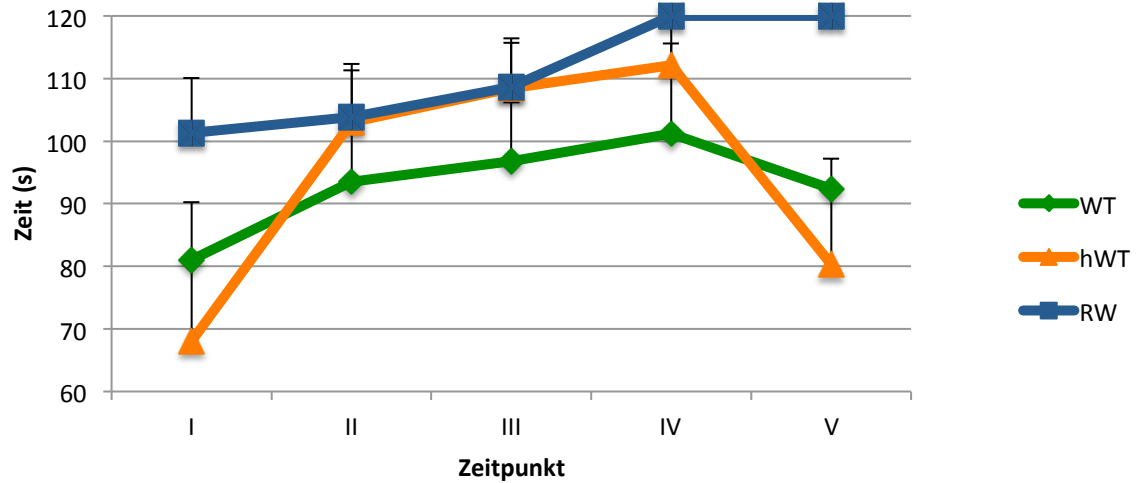


Abb. 18: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Zeit auf dem Rota-ROD der drei Genotypen für die untersuchten Alterszeitpunkte I-V. Da die Interaktion zwischen Genotyp \times Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

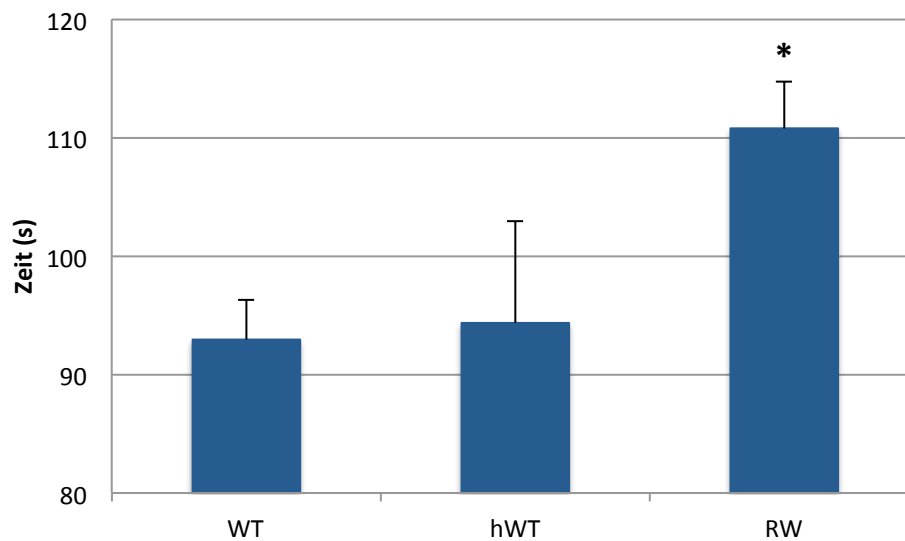


Abb. 19: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Zeit auf dem Rota-ROD für die Tiere der verschiedenen Genotypen (alle fünf Alterszeitpunkte gemittelt). * $p < 0,01$ vs. WT-Tiere und hWT-Tiere; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

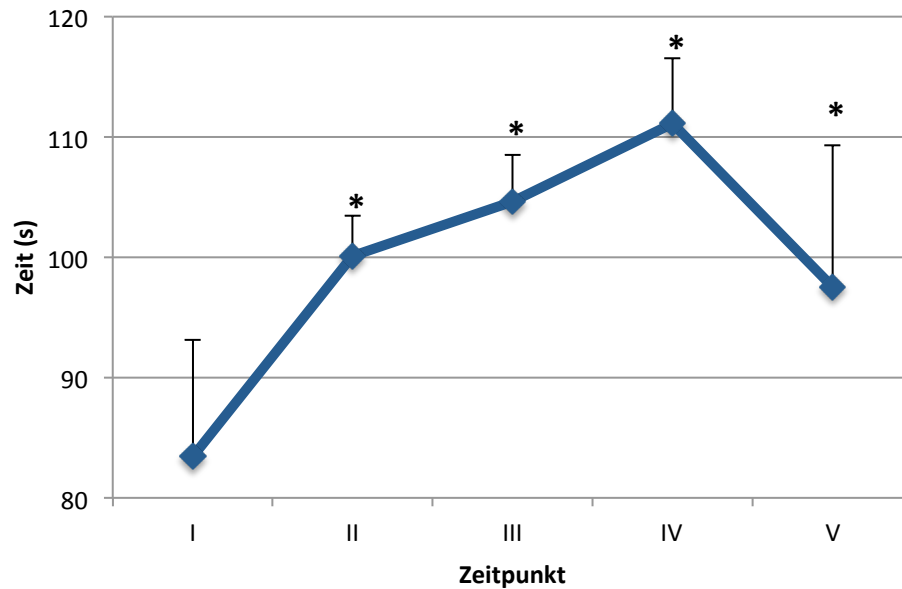


Abb. 20: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Zeit (t max.) auf dem Rota-ROD für alle fünf Alterszeitpunkte (alle Genotypen gemittelt). * $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt I; AVOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

3.3 OFT

Geschwindigkeit

Die 2-Way-ANOVA zeigte für die Geschwindigkeit im OFT (Tab. 8, Abb. 21) einen signifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,001$), sowie eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp x Alter ($p < 0,05$). Mit dem post hoc LSD Test konnte eine signifikant höhere Geschwindigkeit der RW-Tiere für alle Alterszeitpunkte im Vergleich zu den hWT-Tieren und den WT-Tieren (jeweils $p < 0,001$) gezeigt werden.

	I	II	III	IV	V
WT	5,54 \pm 0,24 (27)	4,10 \pm 0,23 (23) [#]	4,59 \pm 0,30 (24) [#]	4,98 \pm 0,43 (23) [#]	4,51 \pm 0,48 (10) [#]
hWT	4,80 \pm 0,34 (20)	3,16 \pm 0,30 (13) [#]	4,52 \pm 0,32 (18) [#]	4,47 \pm 0,33 (18) [#]	4,60 \pm 0,27 (10) [#]
RW	7,94 \pm 0,85 (25) *	6,73 \pm 0,50 (20)* [#]	9,12 \pm 0,46 (19)* [#]	9,80 \pm 0,49 (19)* [#]	8,87 \pm 0,39 (10)* [#]

Tab. 8: Mittelwerte \pm SEM der Geschwindigkeit (cm/s) der drei Genotypen für die Testdurchgänge I-V im OFT. Die Anzahl der getesteten Tiere pro Durchgang ist in Klammern gesetzt. * $p \leq 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe; [#] $p < 0,001$ vs. Zeitpunkt I des selben Genotyps. ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

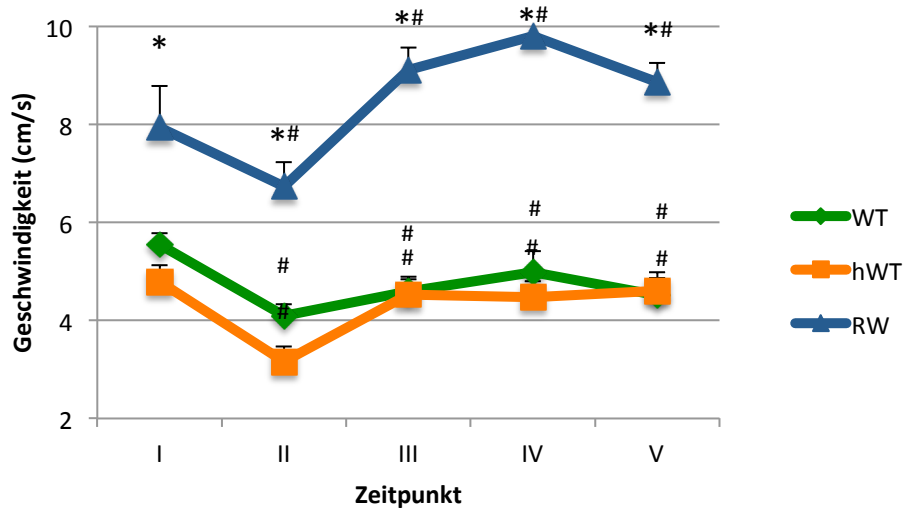


Abb. 21: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Geschwindigkeit (cm/s) der drei Genotypen für die Testdurchgänge I-V im OFT. * $p \leq 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe; # $p < 0,001$ vs. Zeitpunkt I desselben Genotyps; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Strecke

In der 2-Way-ANOVA zeigte sich für die zurückgelegte Strecke im OFT (Tab. 9; Abb. 22) ein signifikanter Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,001$), sowie eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp x Alter ($p < 0,05$). Der post hoc LSD Test zeigte für alle Zeitpunkte eine signifikant längere zurückgelegte Strecke bei den RW-Tieren im Vergleich zu den WT- und hWT-Tieren (jeweils $p < 0,001$).

	I	II	III	IV	V
WT	9961 \pm 423 (27)	7353 \pm 420 (23)	8100 \pm 549 (24)	8969 \pm 782 (23)	8116 \pm 856 (10)
hWT	8626 \pm 606 (20)	5467 \pm 580 (13)	8140 \pm 572 (18)	8046 \pm 595 (18)	8276 \pm 486 (10)
RW	14291 \pm 1520 (25) *	12099 \pm 900 (20) *	16430 \pm 818 (19) *	16430 \pm 818 (19) *	16007 \pm 69 (10) *

Tab. 9: Mittelwerte \pm SEM für die zurückgelegte Strecke in cm pro 30 Minuten für alle fünf Zeitpunkte im Alter von 6 bis 54 Wochen. Die Anzahl der getesteten Tiere pro Genotyp ist in Klammern dargestellt. * $p < 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

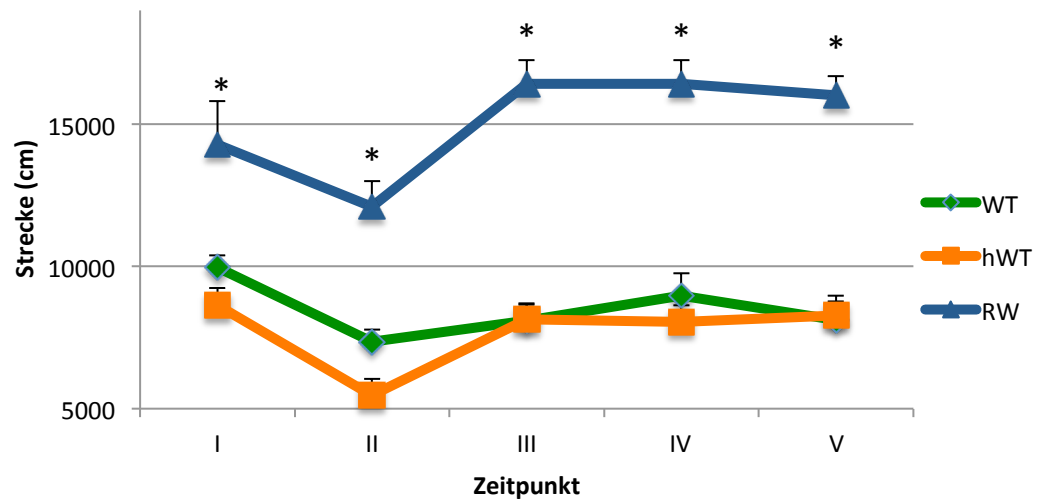


Abb. 22: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der zurückgelegten Strecke (cm) der drei Genotypen für die Testdurchgänge I-V im OFT. * $p < 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Aktivität

Die 2-Way-ANOVA zeigte für die Aktivität im OFT (Tab. 10, Abb. 23) einen signifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,001$), sowie eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp x Alter ($p < 0,001$). Der post hoc LSD Test zeigte eine signifikant höhere Aktivität der RW-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren ($p < 0,01$) und hWT-Tieren ($p < 0,001$) für die Alterszeitpunkte II, III, IV und V.

	I	II	III	IV	V
WT	58,70±1,48 (27)	42,26±1,46 (23)	49,04±1,81 (24)	49,48±2,11 (23)	40,32±2,84 (10)
hWT	55,16±1,82 (20)	37,25±3,18 (13)	50,34±2,64 (18)	48,26±2,20 (18)	43,07±1,57 (10)
RW	56,01±1,95 (25)	50,98±3,18 (16) ^{*,#}	61,24±1,43 (19) ^{*,#}	59,08±2,00 (19) ^{*,#}	57,62±1,43 (10) ^{*,#}

Tab. 10: Mittelwerte ± SEM der Aktivität im OFT (% der gesamten Beobachtungsdauer) für die drei Genotypen aller fünf Alterszeitpunkte. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe ist in Klammern dargestellt. * $p < 0,01$ vs. WT-Tiere und # $p < 0,001$ vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

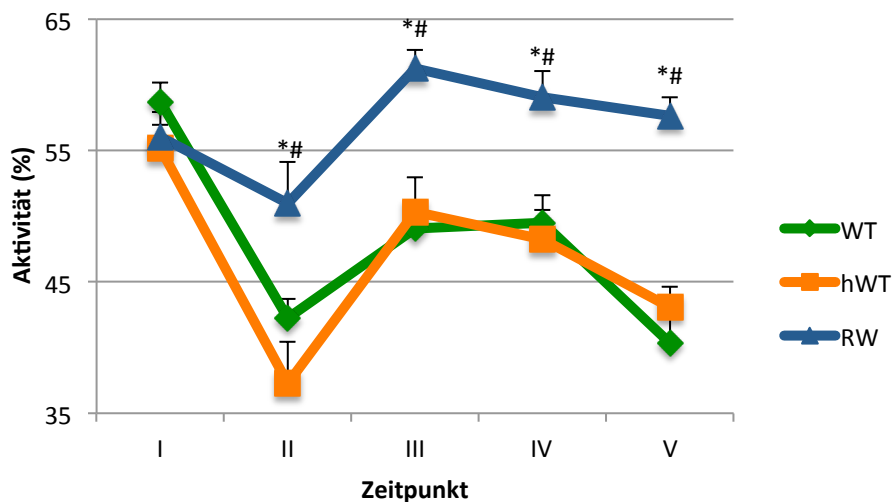


Abb. 23: Graphische Darstellung der Mittelwerte ± SEM der Aktivität im OFT (%) der drei Genotypen für die Testdurchgänge I-V. * $p < 0,01$ vs. WT-Tiere und # $p < 0,001$ vs. hWT-Tiere derselben Altersgruppe; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

3.4 OWT

Aufenthaltsdauer

Für die *Aufenthaltsdauer im Bereich des neuen Objektes* (Tab. 11, Abb. 24) zeigte die 2-Way-ANOVA einen signifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,05$). Eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter zeigte sich aber nicht. Der post hoc LSD Test zeigte eine signifikant längere Aufenthaltsdauer im Bereich des neuen Objektes bei den RW-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren und hWT-Tieren (jeweils $p < 0,001$). Bezüglich des Alters zeigte der post hoc LSD Test eine signifikant längere Aufenthaltsdauer im Bereich des neuen Objektes zu den Zeitpunkten II, IV und V im Vergleich zu Zeitpunkt I.

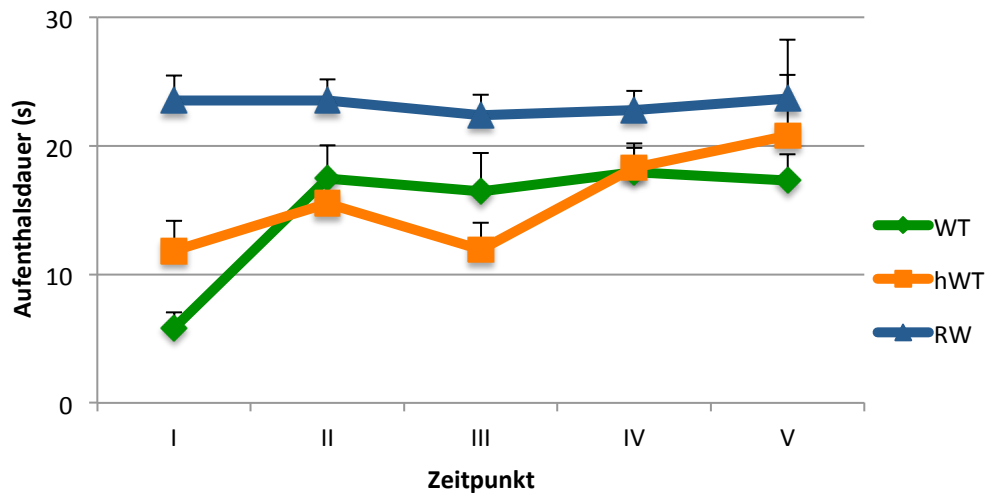
Für die *Aufenthaltsdauer im Bereich des bekannten Objektes* (Tab. 11, Abb. 25) zeigte die 2-Way-ANOVA einen signifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,01$) sowie eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter ($p < 0,001$). Im post hoc LSD Test ergaben sich signifikant längere Zeiten der RW-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren ($p < 0,01$) für die Zeitpunkte I und II und im Vergleich zu den hWT-Tieren ($p < 0,05$) für den Zeitpunkt I.

	I	II	III	IV	V
RW					
Neues Objekt	23,5±2,0 (24)	23,5±2,7 (19)	22,4±2,6 (19)	22,8±2,0 (16)	23,7±3,7 (10)
Bekanntes Objekt	27,0±3,5 (24)* [#]	18,8±2,2 (19)*	14,8±2,2 (19)	21,6±2,7 (16)	14,5±2,6 (10)
hWT					
Neues Objekt	11,9±2,6 (20)	15,5±2,4 (21)	11,9±2,9 (14)	18,3±2,5 (16)	20,8±3,5 (10)
Bekanntes Objekt	11,1±1,8 (20)	16,0±2,6 (21)	10,5±2,8 (14)	18,3±3,9 (16)	10,4±2,1 (10)
WT					
Neues Objekt	5,8±1,2 (26)	17,5±2,6 (25)	16,5±3,0 (27)	18,0±2,2 (20)	17,3±2,0 (10)
Bekanntes Objekt	9,5±1,4 (26)	10,0±1,3 (25)	17,5±2,7 (27)	20,2±2,3 (20)	9,2±1,9 (10)

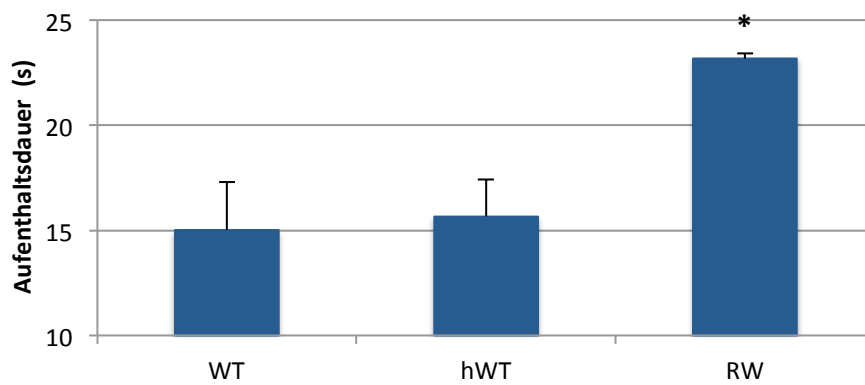
Tab. 11: Mittelwerte ± SEM der Aufenthaltsdauer (s) im Bereich des bekannten sowie des neuen Objektes der drei Genotypen zu den fünf Alterszeitpunkten. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Testdurchgang ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter für die Aufenthaltsdauer im Bereich des neuen Objektes im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt. Für die Aufenthaltsdauer im Bereich des bekannten Objektes: * $p < 0,01$ vs. WT-Tiere; [#] $p < 0,05$ vs. hWT-Tiere; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

a

58



b



c

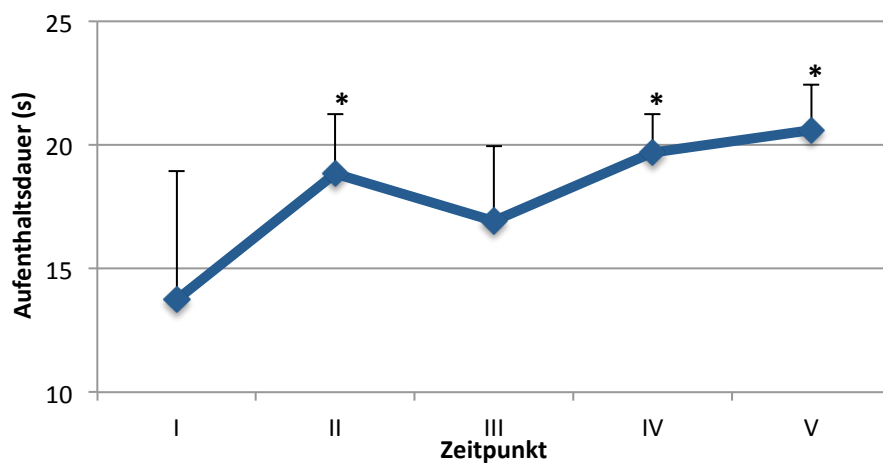


Abb. 24: Graphische Darstellung der mittleren Aufenthaltsdauer \pm SEM im Bereich des **neuen Objektes** der drei Genotypen im zeitlichen Verlauf (a), der drei Genotypen (alle fünf Alterszeitpunkte gemittelt) (b), und im zeitlichen Verlauf (alle Genotypen gemittelt) (c). Da die Interaktion zwischen Genotyp \times Alter für die Aufenthaltsdauer im Bereich des neuen Objektes im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen in (a) nicht dargestellt. Für (b) gilt $*p < 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere; für (c) gilt $*p < 0,05$ vs. Zeitpunkt I; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

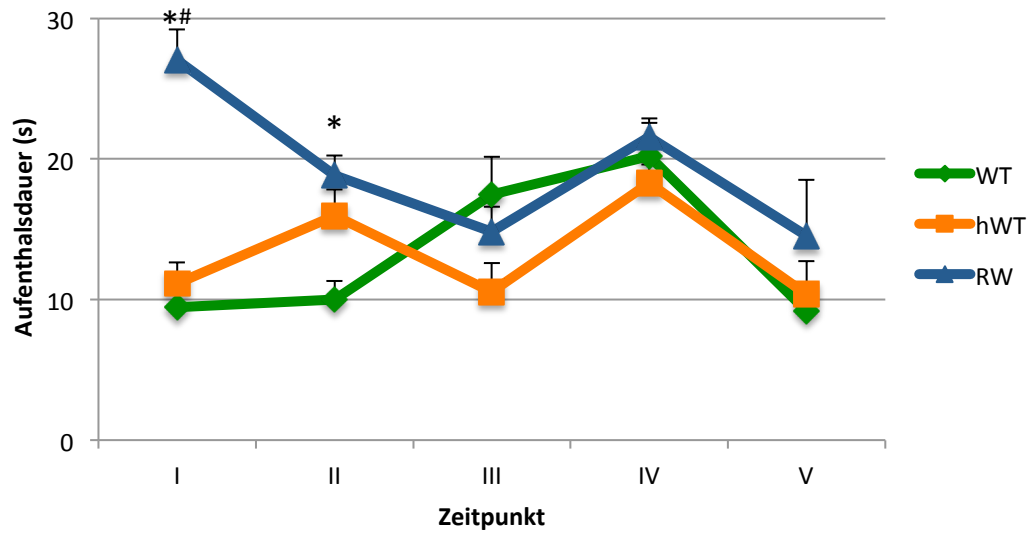


Abb. 25: Graphische Darstellung der mittleren Aufenthaltsdauer \pm SEM im Bereich des **bekannten Objektes** der drei Genotypen im zeitlichen Verlauf. * $p < 0,01$ vs. WT-Tiere, # $p < 0,05$ vs. hWT-Tiere; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Verhältnis der Aufenthaltsdauer beim neuen und bekanntem Objekt

Die 2-Way-ANOVA zeigte für das Verhältnis der Aufenthaltsdauer beim neuen Objekt zur Aufenthaltsdauer beim bekannten Objekt einen signifikanten Effekt des Alters ($p < 0,01$) aber keinen signifikanten Effekt des Genotyps (Tab. 12, Abb. 26). Der post hoc LSD Test zeigte signifikant höhere Werte für alle Tiere zu den Zeitpunkten II, III und V im Vergleich zum Zeitpunkt I ($p < 0,05$; Abb. 21).

	I	II	III	IV	V
WT	0,6±0,1 (20)	3,3±0,9 (25)	1,3±0,3 (25)	1,2±0,2 (20)	2,9±0,8 (10)
hWT	1,3±0,3 (19)	1,5±0,3 (21)	2,3±0,7 (14)	1,4±0,2 (16)	2,6±0,7 (10)
RW	1,2±0,2 (24)	1,9±0,5 (19)	2,4±0,5 (19)	1,4±0,3 (16)	2,1±0,5 (10)

Tab. 12: Dargestellt ist das Verhältnis der Aufenthaltsdauer beim neuen Objekt zur Aufenthaltsdauer beim alten Objekt für alle Genotypen zu den fünf Alterszeitpunkten. Werte >1 legen nahe, dass physiologischerweise das alte Objekt erkannt wurde („object recognition“) und das neue Objekt wurde gesucht („novelty seeking“); Werte ~ 1 legen nahe, dass das alte Objekt nicht erkannt wurde; Werte <1 legen nahe, dass das neue Objekt erkannt und vermieden wurde („novelty avoiding“). Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Testdurchgang ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

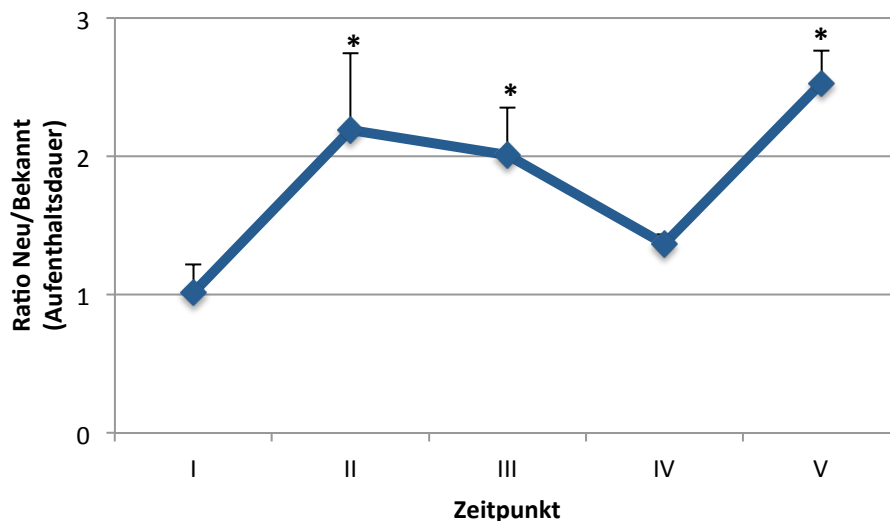


Abb. 26: Graphische Darstellung der Aufenthaltsdauer im Bereich des neuen Objektes im Verhältnis zur Aufenthaltsdauer im Bereich des bekannten Objektes, dargestellt zu den fünf Alterszeitpunkten (alle Genotypen gemittelt). * $p < 0,05$ vs. Zeitpunkt I; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Anzahl der Besuche

Die 2-Way-ANOVA zeigte für die *Anzahl der Besuche des neuen Objektes* (Tab. 13, Abb. 27) einen signifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,001$), aber keine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter. Der post hoc LSD Test zeigte eine signifikant höhere Anzahl an Besuchen des neuen Objektes für die RW-Tiere im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren (jeweils $p < 0,001$). Bezüglich des Alters zeigte der post hoc LSD Test signifikante Unterschiede für den Testzeitpunkt V im Vergleich zu den Zeitpunkten I bis IV (jeweils $p < 0,001$).

Auch für die *Anzahl der Besuche des bekannten Objektes* (Tab. 13, Abb. 28) zeigte sich in der 2-Way-ANOVA ein signifikanter Effekt des Genotyps ($p < 0,001$). Ein signifikanter Effekt des Alters oder der Interaktion zwischen Genotyp und Alter zeigte sich nicht. Für die Anzahl der Besuche des bekannten Objektes zeigte der post hoc LSD Test für die RW-Tiere signifikant höhere Werte im Vergleich zu den WT-Tieren und den hWT-Tieren (jeweils $p < 0,001$).

	I	II	III	IV	V
RW					
Neues Objekt	21,2±1,9 (24)	19,5±1,7 (19)	18,0±1,6 (19)	17,2±1,5 (16)	29,1±4,7 (10)
Bekanntes Objekt	21,9±2,1 (24)	17,0±1,4 (19)	13,6±1,8 (19)	15,6±1,3 (16)	17,4±4,0 (10)
hWT					
Neues Objekt	11,7±2,3 (20)	13,6±1,6 (21)	10,6±2,1 (14)	14,3±1,6 (16)	24,6±4,7 (10)
Bekanntes Objekt	10,7±1,5 (20)	14,2±1,8 (21)	9,1±2,0 (14)	11,4±1,3 (16)	14,2±2,4 (10)
WT					
Neues Objekt	7,4±1,4 (26)	13,8±1,5 (25)	12,6±1,9 (27)	14,6±1,7 (20)	20,4±2,8 (10)
Bekanntes Objekt	11,2±1,7 (26)	10,6±1,0 (25)	11,7±1,3 (27)	10,8±1,5 (20)	12,2±2,5 (10)

Tab. 13: Mittelwerte \pm SEM der Anzahl der Besuche des bekannten sowie des neuen Objektes der drei Genotypen zu den fünf Alterszeitpunkten. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Testdurchgang ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

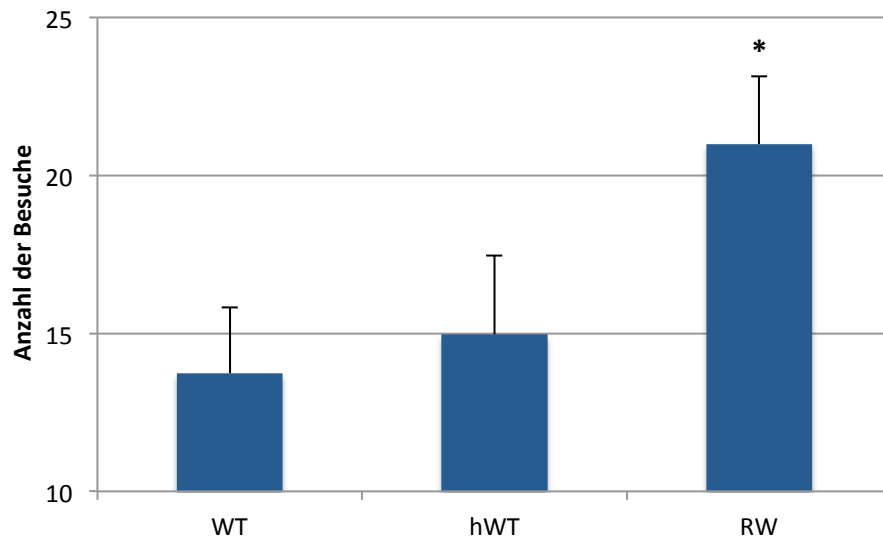
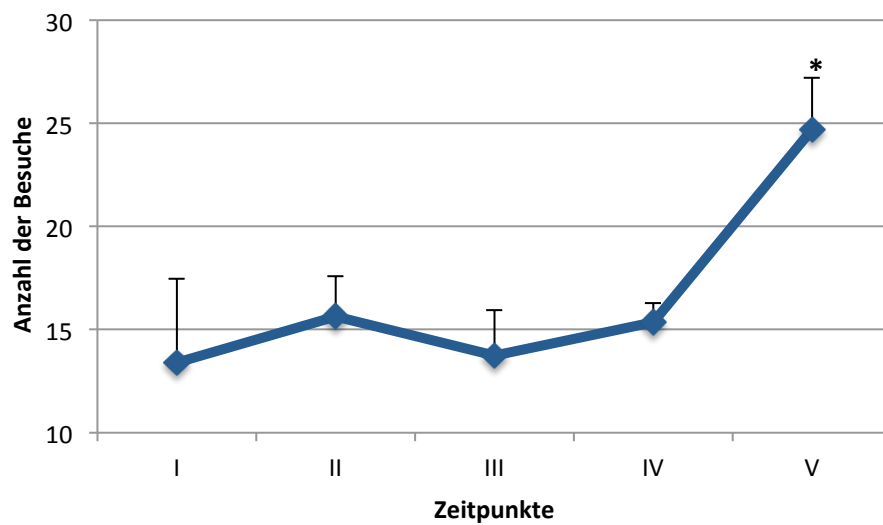
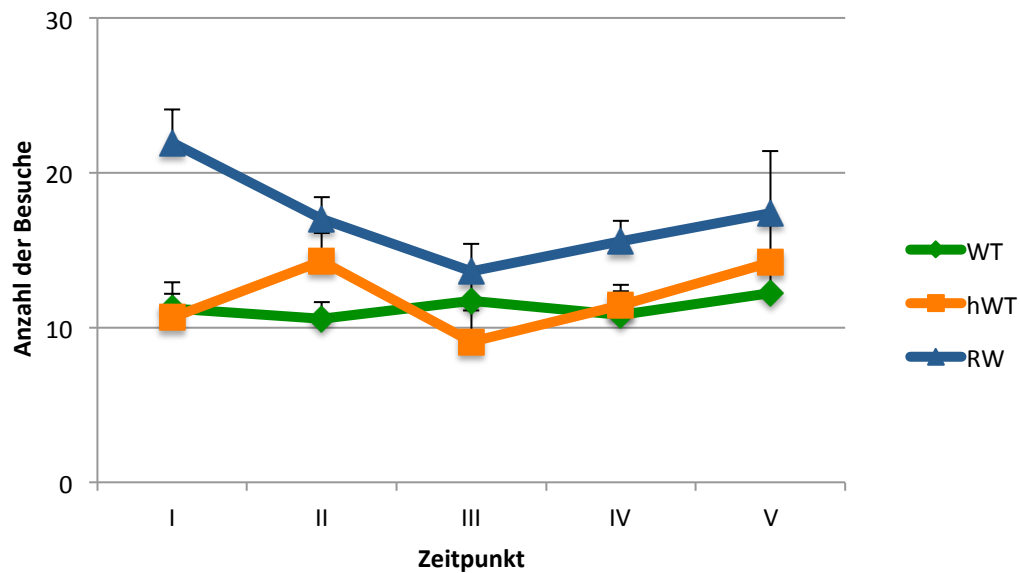
a**b**

Abb. 27: Graphische Darstellung der mittleren Anzahl der Besuche des **neuen Objektes** \pm SEM der drei Genotypen (alle Alterszeitpunkte gemittelt) **(a)** und im zeitlichen Verlauf (alle Genotypen gemittelt) **(b)**. * $p < 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere (a). * $p < 0,001$ vs. Zeitpunkte I-IV (b); ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

a

63



b

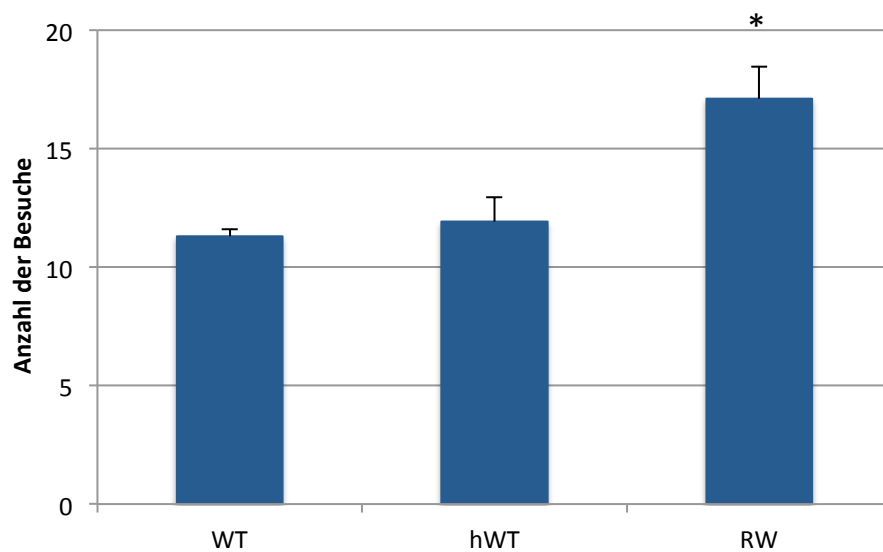


Abb. 28: Graphische Darstellung der mittleren Anzahl der Besuche des **bekannten Objektes** \pm SEM aller experimentellen Bedingungen (alle drei Genotypen und alle fünf Alterszeitpunkte) (a) und für alle Genotypen (alle Alterszeitpunkte gemittelt) (b). Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen in (a) nicht dargestellt. Für (b) gilt: * $p < 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere (b); ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Verhältnis der Besuche beim neuen und bekannten Objekt

Die 2-Way-ANOVA zeigte für das Verhältnis der Anzahl der Besuche beim neuen Objekt zur Anzahl der Besuche beim bekannten Objekt (Tab. 14, Abb. 29) einen signifikanten Effekt des Alters ($p < 0,01$), aber nicht des Genotyps oder der Interaktion zwischen Genotyp und Alter. Der post hoc LSD Test zeigte signifikant höhere Werte für den Alterszeitpunkt V im Vergleich zu den Zeitpunkten I, II und III ($p < 0,05$).

	I	II	III	IV	V
WT	$0,7 \pm 0,1$ (20)	$1,9 \pm 0,4$ (25)	$1,2 \pm 0,2$ (27)	$2,8 \pm 0,8$ (20)	$3,0 \pm 1,0$ (10)
hWT	$1,5 \pm 0,5$ (19)	$1,3 \pm 0,2$ (21)	$2,2 \pm 0,5$ (13)	$1,7 \pm 0,3$ (16)	$2,5 \pm 0,9$ (10)
RW	$1,1 \pm 0,1$ (24)	$1,3 \pm 0,1$ (19)	$2,1 \pm 0,4$ (19)	$1,4 \pm 0,3$ (16)	$2,1 \pm 0,5$ (10)

Tab. 14: Verhältnis der Anzahl der Besuche beim neuen Objekt zur Anzahl der Besuche beim bekannten Objekt für alle fünf Alterszeitpunkte. Werte >1 legen nahe, dass physiologischerweise das bekannte Objekt erkannt wurde („object recognition“) und das neue Objekt wurde gesucht („novelty seeking“); Werte ~ 1 legen nahe, dass das alte Objekt nicht erkannt wurde; Werte <1 legen nahe, dass das neue Objekt erkannt und vermieden wurde („novelty avoiding“). Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Testdurchgang ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

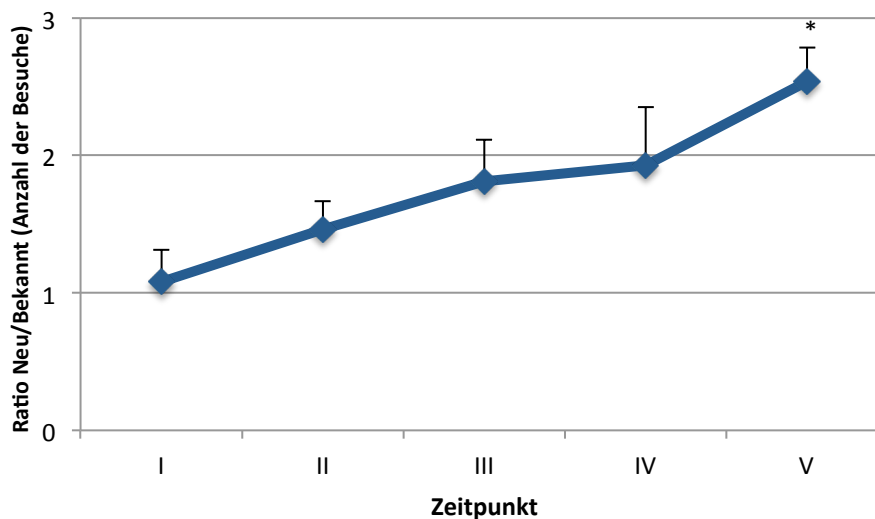


Abb. 29: Graphische Darstellung der Anzahl der Besuche des neuen Objektes im Verhältnis zu der Anzahl der Besuche des bekannten Objektes, dargestellt zu den fünf Alterszeitpunkten (alle Genotypen). * $p < 0,01$ vs. Zeitpunkte I, II und III; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

3.5 FST

Floating

Die 2-Way-ANOVA zeigte für den prozentualen Anteil des Floatings an der gesamten Untersuchungsdauer (Tab. 15, Abb. 30) einen signifikanten Effekt des Genotyps und des Alters (jeweils $p < 0,001$), aber keine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter. Der post hoc LSD Test zeigte eine signifikant niedrigere Floating-Zeit für die RW-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren ($p < 0,05$) und den hWT-Tieren ($p < 0,001$). Bezüglich des Alters zeigte der post hoc LSD Test signifikante Unterschiede zwischen allen Zeitpunkten ($p < 0,01$) mit Ausnahme der Zeitpunkte III und IV, die sich nicht voneinander unterschieden.

	I	II	III	IV	V
WT	79,2±1,9 (19)	88,9±1,2 (20)	50,4±4,1(24)	53,7±3,8 (20)	62,2±7,8 (10)
hWT	80,0±1,9 (18)	88,6±1,8 (18)	51,5±4,7 (18)	55,3±3,0 (12)	66,2±7,3 (10)
RW	74,5±2,8 (22)	88,6±1,2 (19)	37,8±4,5 (19)	41,6±4,0 (15)	53,7±7,0 (10)

Tab. 15: Mittelwerte \pm SEM für den prozentualen Anteil des Floatings an der gesamten Untersuchungsdauer, dargestellt für die fünf Alterszeitpunkte und die drei Genotypen. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

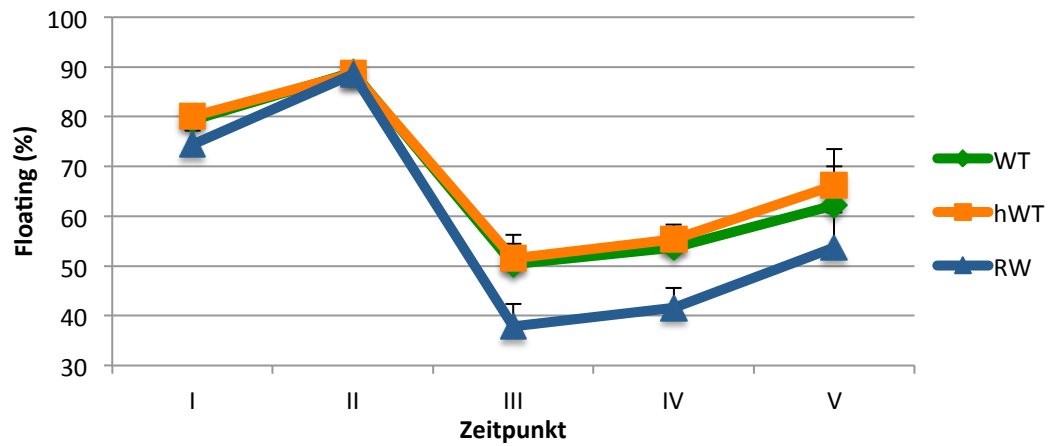
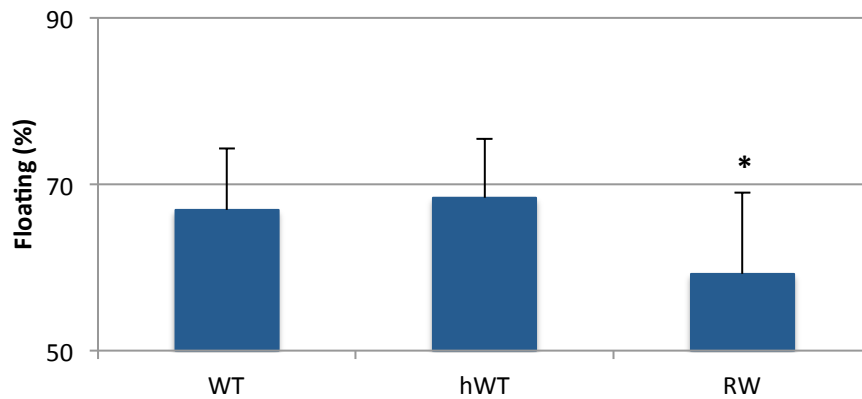
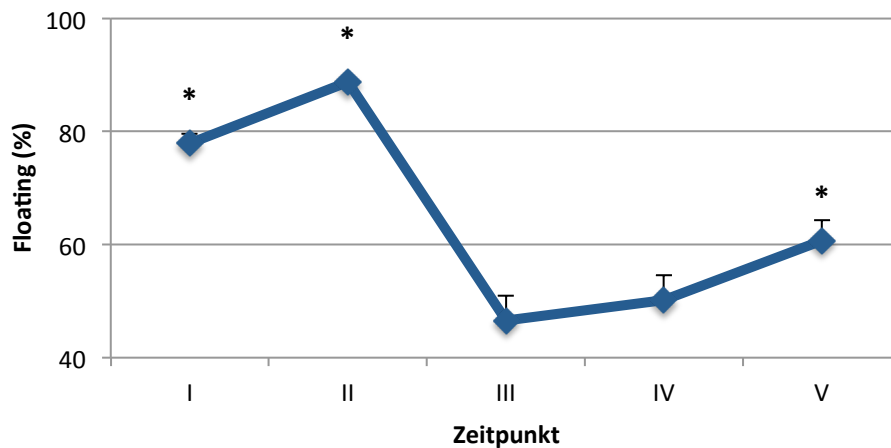
a**b****c**

Abb. 30: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM für den prozentualen Anteil des Floatings an der gesamten Untersuchungsdauer, dargestellt (a) für die fünf Alterszeitpunkte und die drei Genotypen, (b) für die drei Genotypen einzeln (alle Alterszeitpunkte gemittelt) sowie (c) für den zeitlichen Verlauf (alle Genotypen gemittelt). Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen in (a) nicht dargestellt; für (b) gilt: * $p < 0,05$ vs. WT-Tiere und $p < 0,001$ vs. hWT-Tiere; für (c) gilt: * $p < 0,01$ vs. alle Zeitpunkte, nur die Zeitpunkte III und IV unterschieden sich nicht voneinander; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Swimming

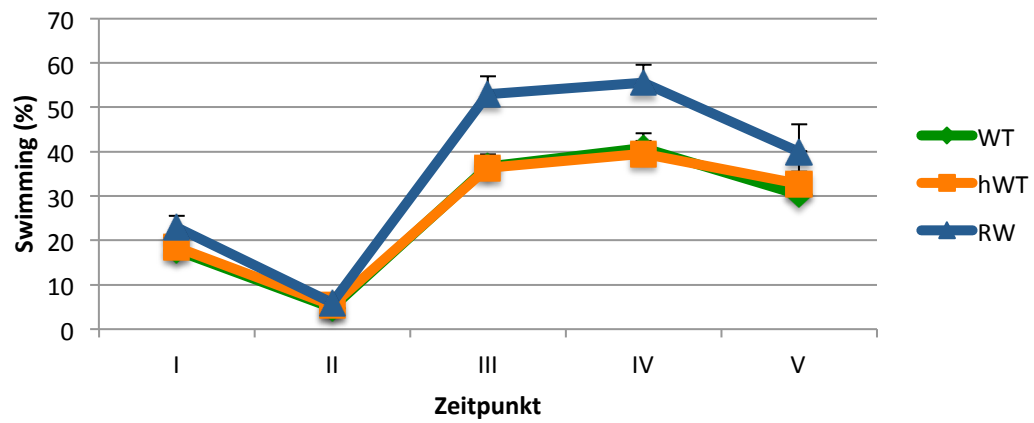
Für den prozentualen Anteil des Swimmings (Tab. 16, Abb. 31) an der gesamten Untersuchungsdauer zeigte die 2-Way-ANOVA einen signifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0,001$) und des Alters ($p < 0,001$). Eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter zeigte sich aber nicht. Der post hoc LSD Test zeigte ein signifikant erhöhtes Swimming für die RW-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren und den hWT-Tieren (jeweils $p < 0,001$). Bezüglich des Alters zeigte der post hoc LSD Test signifikante Unterschiede zwischen allen Zeitpunkten ($p < 0,01$) mit Ausnahme der Zeitpunkte III und IV.

	I	II	III	IV	V
WT	17,7±1,5 (19)	4,8±0,4 (20)	36,7±2,8 (24)	40,8±3,3 (20)	30,4±5,1 (10)
hWT	18,5±1,8 (18)	5,4±0,7 (18)	36,4±2,5 (18)	39,5±3,0 (12)	32,8±7,3 (10)
RW	23,0±2,6 (22)	5,9±0,6 (19)	52,9±4,0 (19)	55,6±4,0 (15)	39,9±6,3 (10)

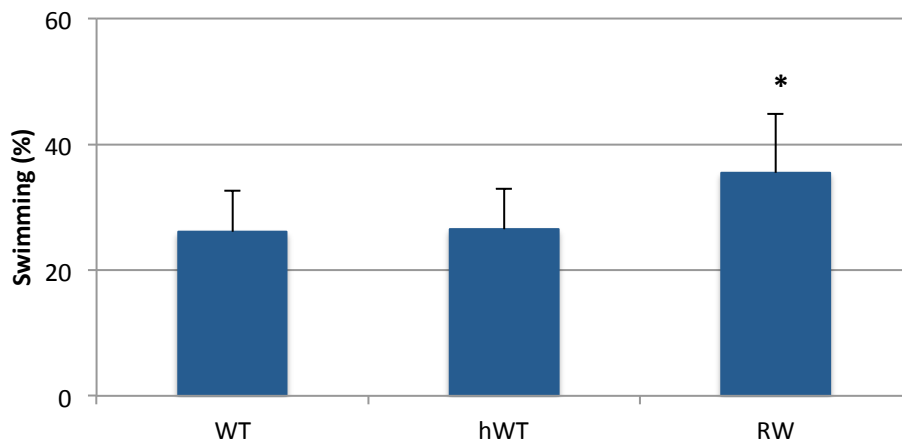
Tab. 16: Mittelwerte \pm SEM für den prozentualen Anteil des Swimmings an der gesamten Untersuchungsdauer, dargestellt zu den fünf Testzeitpunkten für die drei Genotypen. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

a

68



b



c

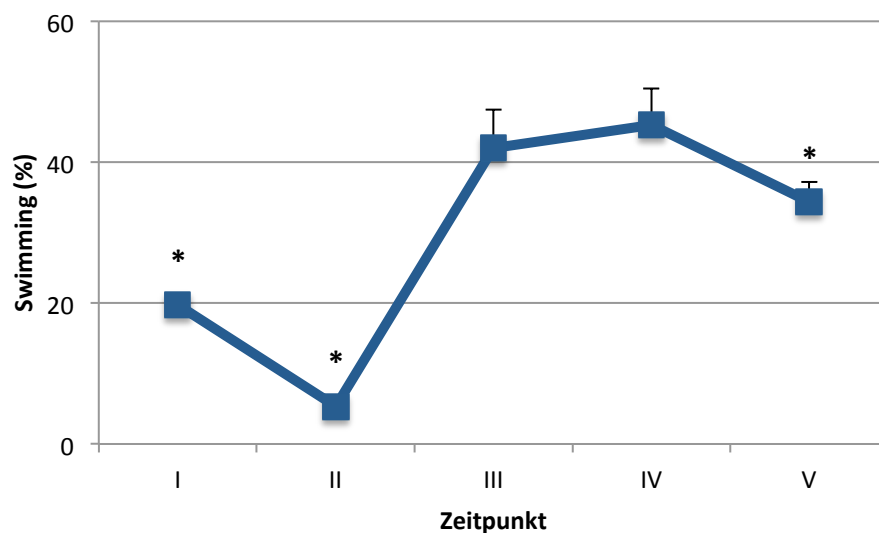


Abb. 31: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM für den prozentualen Anteil des Schwimmings an der gesamten Untersuchungsdauer der drei Genotypen im zeitlichen Verlauf (a), der drei Genotypen (alle fünf Alterszeitpunkte gemittelt) (b), und im zeitlichen Verlauf (alle Genotypen gemittelt) (c). Da die Interaktion zwischen Genotyp \times Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen in (a) nicht dargestellt; für (b) gilt: $*p < 0,001$ vs. WT-Tiere und vs. hWT-Tiere; für (c) gilt: $*p < 0,01$ vs. alle Zeitpunkte mit Ausnahme der Zeitpunkte III und IV (c); ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

Struggling

Für den prozentualen Anteil des Strugglings an der gesamten Untersuchungsdauer (Tab. 17, Abb. 32) zeigte die 2-Way-ANOVA einen signifikanten Effekt des Alters ($p < 0,001$), aber nicht des Genotyps. Eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Alter zeigte sich ebenfalls nicht. Der post hoc LSD Test zeigte signifikante Unterschiede der Alterszeitpunkte II und III im Vergleich zu Zeitpunkt I ($p < 0,01$), sowie signifikante Unterschiede der Zeitpunkte II, IV und V im Vergleich zu Zeitpunkt III ($p < 0,01$).

	I	II	III	IV	V
WT	3,1±1,0(19)	5,7±1,0 (20)	13,0±2,0 (24)	5,5±0,9 (20)	7,5±3,0 (10)
hWT	1,5±0,5 (18)	6,0±1,3 (18)	12,1±2,6 (18)	5,1±1,3 (12)	1,1±0,3 (10)
RW	2,3±1,2 (22)	5,6±0,8 (19)	8,7±1,6 (19)	2,8±0,4 (15)	6,4±1,4 (10)

Tab. 17: Mittelwerte \pm SEM für den prozentualen Anteil des Strugglings an der gesamten Untersuchungsdauer, dargestellt zu den fünf Alterszeitpunkten für die drei Genotypen. Die Anzahl der untersuchten Tiere pro Gruppe ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

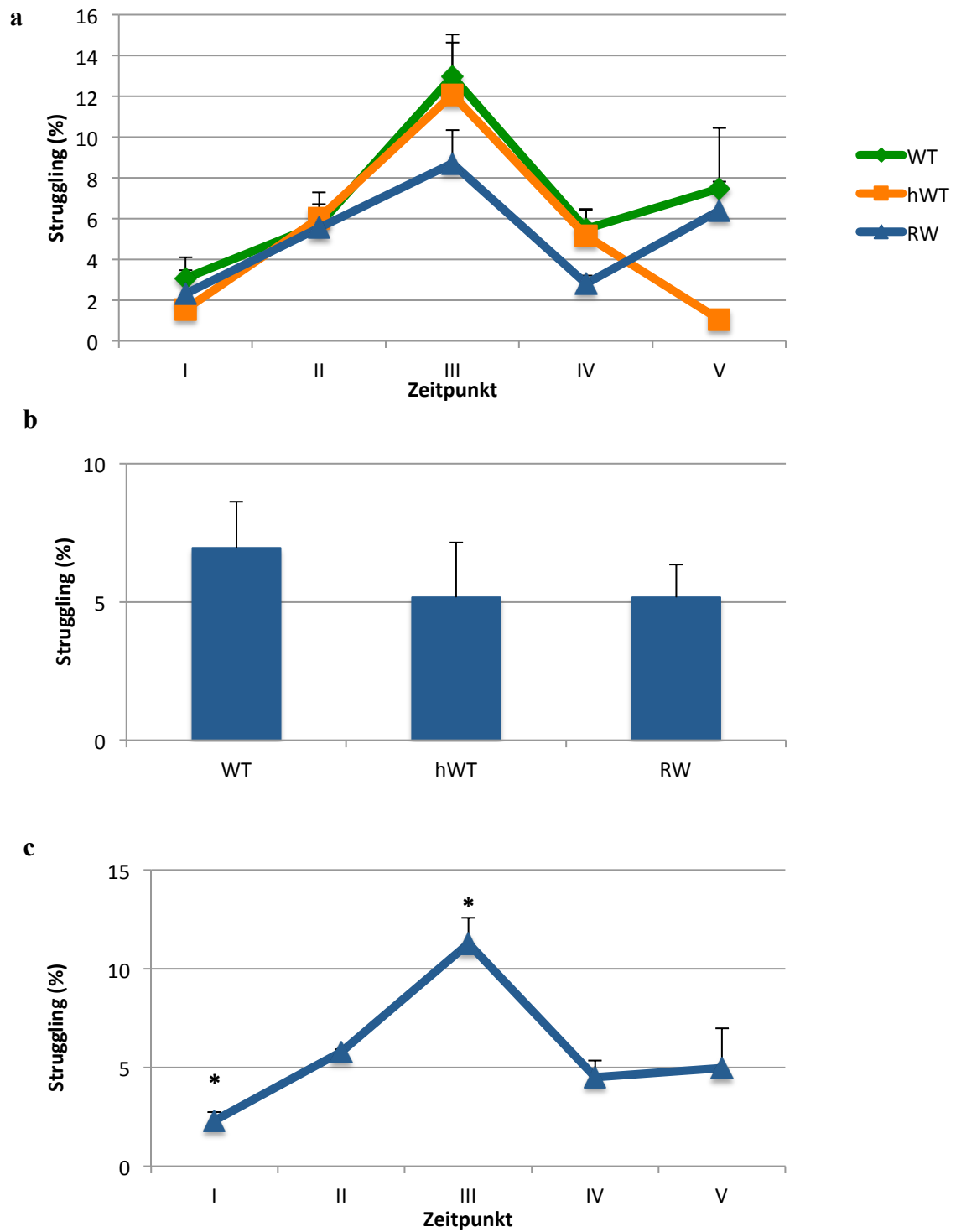


Abb. 32: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM für den prozentualen Anteil des Strugglings an der gesamten Untersuchungsdauer der drei Genotypen im zeitlichen Verlauf, (a), der drei Genotypen (alle fünf Alterszeitpunkte gemittelt) (b) und im zeitlichen Verlauf (alle Genotypen gemittelt) (c). Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen in (a) nicht dargestellt; für c) gilt: * $p < 0,01$ Zeitpunkt I vs. II und III sowie Zeitpunkt III zu II, IV und V; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

3.6 SIT

Anzahl der Kontakte

Für die Anzahl der Kontakte (Tab. 18, Abb. 33 a und b) zeigte sich in der 2-Way-ANOVA ein signifikanter Effekt des Genotyps ($p < 0,05$), aber nicht des Alters. Eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp x Alter zeigte sich ebenfalls nicht. Der post hoc LSD Test zeigte eine signifikant höhere Anzahl der Kontakte der Testpaare RW/WT im Vergleich zu den Testpaaren hWT/WT ($p < 0,01$).

	I	II	III	IV	V
hWT/WT	119,0±5,9 (21)	117,3±5,4 (20)	139,0±10,1 (10)	144,5±9,9 (8)	145,0±5,6 (10)
RW/WT	147,6±5,4 (23)	142,0±6,0 (21)	135,7±9,3 (15)	149,1±10,7 (8)	143,1±3,9 (10)

Tab. 18: Mittelwerte ± SEM der Anzahl der Kontakte zwischen den Testpaaren hWT/WT und RW/WT der fünf Alterszeitpunkte. Die Anzahl der untersuchten Paare ist in Klammern dargestellt. Da die Interaktion zwischen Genotyp x Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen nicht dargestellt.

Kontaktzeit

Für die Kontaktzeit (Tab. 19, Abb. 33 c) zeigte die 2-Way-ANOVA einen signifikanten Effekt des Genotyps ($p < 0,01$) und des Alters ($p < 0,01$), sowie eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp x Alter ($p < 0,01$). Im post hoc LSD Test zeigte sich eine signifikant geringere Kontaktzeit der Paare RW/WT im Vergleich zu den Paaren hWT/WT zu den Zeitpunkten III und IV (jeweils $p < 0,05$).

	I	II	III	IV	V
hWT/WT	539,9±24,6 (21)	496,0±33,9 (20)	541,6±36,4 (10)	563,1±38,8 (8)	521,1±29,7 (10)
RW/WT	607,7±25,1 (23)	507,0±31,1 (21)	387,8±30,8 (15)*	411,6±33,6 (8)*	436,9±14,6 (10)

Tab. 19: Mittelwerte ± SEM der Kontaktzeit zwischen den Testpaaren hWT/WT und RW/WT zu den fünf Alterszeitpunkten. Die Anzahl der untersuchten Paare ist in Klammern dargestellt. * $p < 0,001$ vs. hWT/WT-Paare am selben Zeitpunkt; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

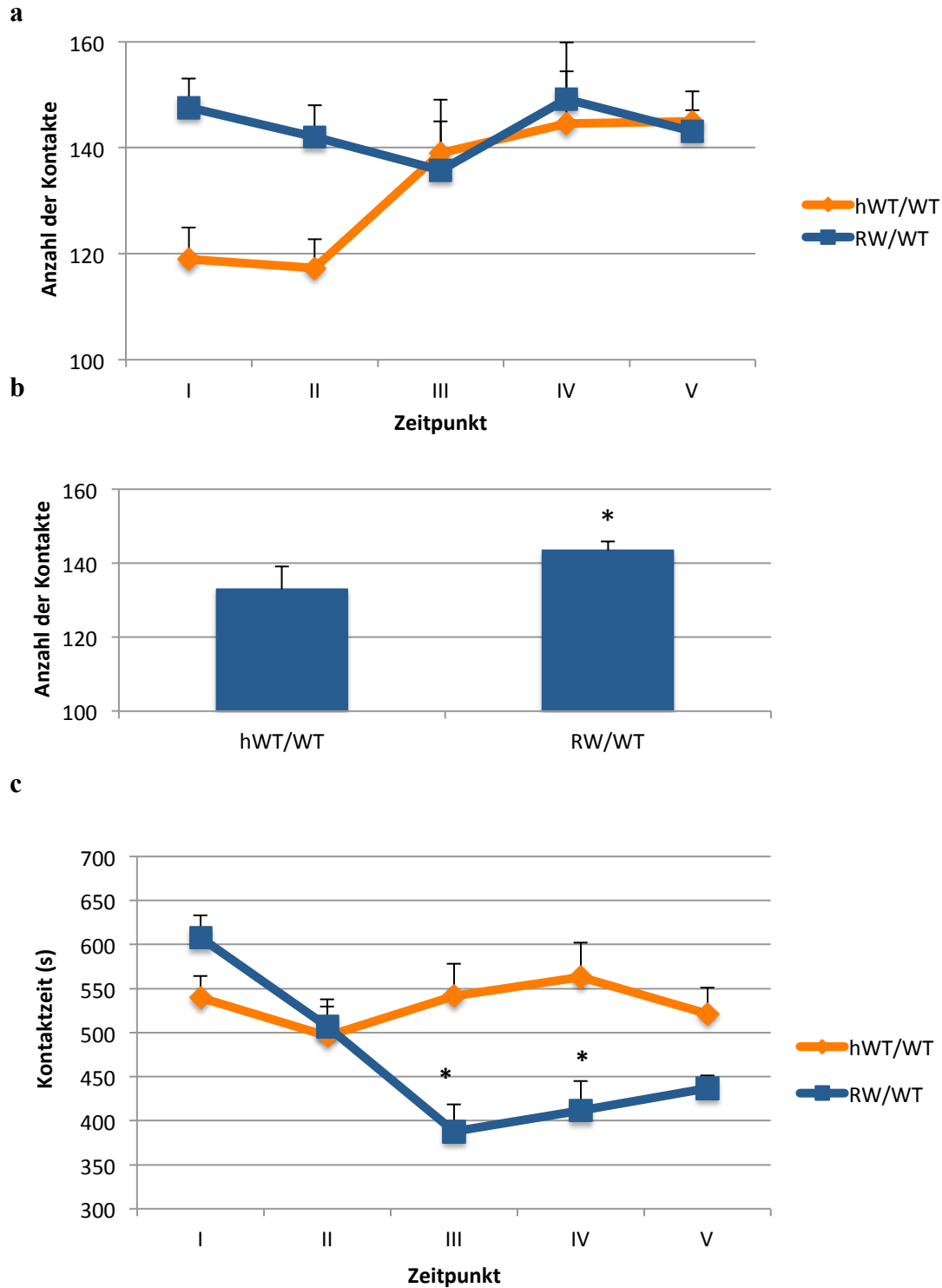


Abb. 33: Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Anzahl der sozialen Kontakte der Testpaare im zeitlichen Verlauf (**a**) und der Testpaare über alle fünf Alterszeitpunkte gemittelt (**b**) sowie Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Kontaktzeit der Testpaare im zeitlichen Verlauf (**c**). Da die Interaktion zwischen Genotyp \times Alter im ANOVA nicht signifikant war, ist der statistische Vergleich aller Untergruppen in (a) nicht dargestellt; für (b) gilt: $*p < 0,05$ vs. hWT/WT-Paare; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test. Für (c) gilt: $*p < 0,05$ vs. hWT/WT-Paare zum selben Zeitpunkt; ANOVA gefolgt vom post hoc LSD Test.

4 Diskussion

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war, zwei transgene Mausmodelle (RW, hWT) im Vergleich zu einer nicht-transgenen Kontrollgruppe (WT), mit Hilfe einer Testbatterie, bestehend aus den fünf genannten unterschiedlichen Testmethoden (OFT, OWT, Rota-ROD, FST, SIT) zu untersuchen, um festzustellen, ob diese Tiere Verhaltensauffälligkeiten aufweisen, die typischerweise bei FTDP-17 Patienten beobachtet werden (akinetisch-rigides Syndrom, Gedächtnisstörungen, Depression, frontale Enthemmung (Disinhibition) und soziale Rückzugstendenzen). In der nachfolgenden Diskussion werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen Tests interpretiert, dann das Auftreten der o.g. Symptome erörtert und abschließend ein Ausblick auf nachfolgende Arbeiten auf der Basis der hier erhobenen Befunde gegeben.

4.1 Körpergewicht

Bei der Messung des Körpergewichts wurden die Tiere aller drei Gruppen jeweils am selben Tag und mit derselben Waage gewogen. Technisch bedingte Differenzen sind daher nicht anzunehmen. Die statistische Auswertung der Körpergewichtsmessung zeigte bezüglich des Alters einen kontinuierlichen Anstieg des Körpergewichtes für alle drei Genotypen. Alle Tiere unterlagen denselben Haltungsbedingungen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser, wodurch sich der kontinuierliche Anstieg des Körpergewichtes in allen drei Gruppen erklären lässt, welcher einer normalen physiologischen Gewichtsentwicklung entspricht.

Da sich zu keinem der fünf Messzeitpunkte signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen WT und hWT fanden, ist anzunehmen, dass die Expression von humanem nicht-mutierten Tau-Protein das Gewicht der Tiere nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die RW-Tiere zu allen Alterszeitpunkten ein signifikant geringeres Körpergewicht im Vergleich zu den WT-Tieren und den hWT-Tieren. Dieses Ergebnis lässt sich möglicherweise als Folge eines erhöhten Grundumsatzes erklären, der sich aus einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität ergibt, die sich z.B. im OFT als gesteigertes exploratives Verhalten mit erhöhter Aktivität und längerer zurückgelegter Strecke manifestiert (siehe Diskussion OFT). Unsere Ergebnisse sind konsistent mit einer Untersuchung von Pennanen und Kollegen aus 2004 an fünf Monate alten Mäusen, welche P301L-mutiertes Tau überexprimierten, und ebenfalls ein signifikant niedrigeres Gewicht im Vergleich zu den nicht-transgenen WT-Tieren aufwiesen (Pennanen et al., 2004).

4.2 Rota-ROD

Bei der Durchführung des Rota-ROD wurden alle Tiere jeweils am selben Tag, zu der selben Tageszeit und mit der gleichen Testapparatur untersucht. Die maximal auf dem Rota-ROD verbrachte Zeit wurde durch den Kontakt mit dem Boden der Apparatur automatisiert ermittelt,

daher sind Fehlerquellen durch den Beobachter weitestgehend auszuschließen. Die bei allen drei Genotypen im Alterungsverlauf bei der Rota-ROD Untersuchung nachweisbare signifikant geringere Anzahl an Versuchen sowie die signifikant längere auf dem Rota-ROD verbrachte Zeit sind am ehesten durch einen Trainingseffekt zu erklären. Dieser Effekt war zum Zeitpunkt V nicht mehr nachweisbar, möglicherweise da zwischen den Testdurchgängen IV und V eine große Latenz gelegen hat. In der statistischen Auswertung der Rota-ROD Untersuchung zeigten sich weder bei den hWT-Tieren noch bei den RW-Tieren Hinweise auf motorische Defizite im Vergleich zu den WT-Tieren. Im Gegenteil konnten die RW-Tiere im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen sogar eine signifikant längere Zeit auf dem Rota-ROD balancieren und benötigten hierfür auch eine signifikant geringere Anzahl an Versuchen. Zu keinem Zeitpunkt konnten also für die drei untersuchten Gruppen motorische Defizite nachgewiesen werden. Auch bei den anderen, im Rahmen der Studie durchgeführten Verhaltenstests (OFT und FST, s.u.) konnten ebenfalls zu keinem Zeitpunkt motorische Defizite beobachtet werden. Daher haben wir keinen Hinweis auf die Entwicklung von Paraparesen der Hinterläufe oder eines akinetisch-rigiden Parkinson Syndroms der hWT- oder RW-Tiere erhoben. Unsere Untersuchungen legen bei der besseren Performance der RW-Tieren im Vergleich zu den hWT- und den WT-Tieren im Rota-ROD Test eine erhöhte lokomotorische Fähigkeit der RW-Tiere nahe. In einer Studie von Tatebayashi und Kollegen von 2002 konnten bei Mäusen, die unter einem anderen Promotor (Alpha-Calmodulin-Kinase II) ebenfalls die längste Isoform von R406W-mutiertem Tau überexprimierten (16 bis 23 Monate), wie in unserer Untersuchung auch, ebenfalls keine motorischen Defizite im Rota-ROD gezeigt werden (Tatebayashi et al., 2002). Verbesserte motorische Leistungen der transgenen R406W-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren zeigten sich aber bei deren Tiere nicht.

4.3 OFT

Bei der Durchführung der Tests wurden alle Tiere jeweils am gleichen Tag und in der gleichen Testapparatur untersucht. Da die ermittelten Parameter über eine Kamera erfasst und durch eine Software ausgewertet wurden, sind Fehlerquellen durch den Untersucher unwahrscheinlich.

Bei der Auswertung des OFT zeigten sich für alle drei untersuchten motorischen Parameter (Track-Länge, Geschwindigkeit und Aktivität) für die RW-Tiere signifikant bessere Ergebnisse im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen (RW und hWT). Die längere zurückgelegte Strecke, die höhere Geschwindigkeit und die vermehrte Aktivität können am ehesten als Ausdruck einer erhöhten lokomotorischen Aktivität der RW-Tiere interpretiert werden. Diese ist im gesamten Zeitverlauf der Untersuchung (in allen durchgeführten OFT) konstant und manifestiert sich weiterhin auch im geringeren Körpergewicht der RW-Tiere und in einer besseren Rota-ROD-Performance (siehe oben). Da bereits durch den Rota-ROD motorische Defizite bei allen drei untersuchten Gruppen ausgeschlossen werden konnten, ist eine

Beeinflussung der OFT-Performance durch diesen Faktor ausgeschlossen. Weiterhin konnten während der Untersuchungen vom Untersuchungsleiter vermehrt Eintritte der RW-Tiere ins Zentrum der Arena im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren beobachtet werden (nicht quantifiziert), was üblicherweise als reduzierte Ängstlichkeit oder Disinhibition gewertet wird (Prut and Belzung, 2003).

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte in der im Abschnitt Rota-ROD bereits erwähnten Studie von Tatebayahi und Kollegen (Tatebayashi et al., 2002) für RW-Tiere (längste Tau-Isoform, Promotor: Alpha-Calmodulin-Kinase II) im Alter von 16 bis 23 Monaten ebenfalls eine erhöhte lokomotorische Aktivität im OFT nachgewiesen werden (Tab. 20), die sich allerdings nur in den ersten 5 Minuten des ebenfalls 30 minütigen OFT manifestierte und in der Gesamtauswertung nicht signifikant war. Dennoch wurden die Ergebnisse von Tatebayahi und Kollegen auch als Ausdruck einer Disinhibition der RW-Tiere gewertet. Weiterhin konnte in der ebenfalls bereits erwähnten Studie von Pennanen und Kollegen (Pennanen et al., 2004, 2006) zu Tau-transgenen Tieren mit P301L-Mutation im Alter von 11 Monaten ebenso ein verstärktes exploratives Verhalten nachgewiesen werden. Überdies zeigten sich signifikant vermehrte Eintritte ins Zentrum der Testanlage (Abb. 20), was ebenfalls dafür spricht, dass die RW-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren weniger Ängstlichkeit zeigten.

Zusammenfassend legen diese Beobachtungen nahe, dass eine gesteigerte motorische Aktivität ein häufig beobachtetes Phänomen bei Tau transgenen Mäusen zu sein scheint und als Ausdruck einer reduzierten Ängstlichkeit und einer psychomotorischen Disinhibition gewertet werden könnte.

4.4 OWT

Wie auch im OFT wurden zur Durchführung des OWT alle Tiere jeweils am gleichen Tag und in der gleichen Testapparatur untersucht und alle zu ermittelnden Parameter wurden über eine Kamera erfasst und durch eine Software ausgewertet. Somit sind durch den Untersucher bedingte Fehlerquellen auch hier unwahrscheinlich. Alle Tiere erhielten die gleiche Art von Objekten, so dass mögliche Unterschiede durch eine Präferenz von unterschiedlichen Materialien oder Farben ebenfalls ausgeschlossen werden können. Da bereits durch den Rota-ROD Test motorische Defizite bei allen drei untersuchten Gruppen ausgeschlossen werden konnten, ist eine Beeinflussung der OWT-Performance durch diesen Faktor ebenfalls nicht gegeben.

Bei der Auswertung des OWT wurden die Aufenthaltsdauer und die Anzahl der Besuche beim neuen und beim bekannten Objekt zueinander ins Verhältnis gesetzt. Ergebnisse > 1 legen nahe, dass das Objekt physiologischerweise erkannt („object recognition“) und das neue Objekt gesucht wurde („novelty seeking“). Werte < 1 legen nahe, dass das bekannte Objekt zwar erkannt, aber vermieden wurde („novelty avoiding“). Im Gegensatz dazu sprachen Werte ~ 1

dafür, dass das bekannte Objekt nicht erkannt wurde. In der statistischen Auswertung zeigte sich für das Verhältnis der Aufenthaltsdauer beim neuen und bekanntem Objekt ein Effekt des Alters mit signifikant höheren Werten (> 1) zu den Testzeitpunkten II, III und V im Vergleich zu Zeitpunkt I. Auch beim Verhältnis der Anzahl der Besuche beim neuen und bekanntem Objekt zeigte sich ein signifikanter Effekt des Alters mit höheren Werten (> 1) für den Alterszeitpunkt V im Vergleich zu den Zeitpunkten I, II und III. Die höheren Werte mit fortschreitendem Alter legten nahe, dass sich im Zeitverlauf eine altersabhängige Verbesserung der Erinnerung bei den Tieren zeigte. Diese Ergebnisse sind am ehesten dadurch zu erklären, dass die Tiere im Sinne eines Lerneffektes, im zeitlichen Verlauf das bekannte Objekt immer besser erinnern konnten und folglich das neue Objekt vermehrt suchten, was ihrer natürlichen Neugierde entspricht („novelty seeking“).

Bei keinem der untersuchten Parameter (Aufenthaltsdauer beim neuen und bekannten Objekt, Anzahl der Besuche beim neuen und bekanntem Objekt und deren Verhältnisse) und zu keinem Alterszeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied für die hWT-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass die Expression von humanem nicht mutierten Tau-Protein keinen negativen Effekt auf die Gedächtnisfunktion hat. Die RW-Tiere hatten signifikant höheren Werte für die Aufenthaltsdauer und die Anzahl der Besuche sowohl beim bekanntem als auch beim neuen Objekt im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren. Dies ist am ehesten als Ausdruck eines verstärkten explorativen Verhaltens zu werten, welches bereits im OFT dokumentiert wurde. Für die RW-Tiere zeigte sich aber für das Verhältnis der Aufenthaltsdauer beim neuen und bekanntem Objekt, sowie für das Verhältnis der Anzahl der Besuche beim neuen und bekanntem Objekt, kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den WT-Tieren und den hWT-Tieren, so dass angenommen werden kann, dass die Expression von humanem Tau-Protein mit der R406W-Mutation ebenfalls keinen im OWT erfassbaren negativen Effekt auf die Gedächtnisleistung hat.

Eine vorausgehende Untersuchung des Gedächtnis bei 16 bis 23 Monate alten RW-Tieren (längste Tau-Isoform, Promotor: Alpha-Calmodulin-Kinase II) von Tatebayashi und Kollegen aus dem Jahr 2002 (Tab. 20) zeigte, dass diese im Angst-Konditionierungstest deutliche Gedächtnisdefizite aufwiesen (Tatebayashi et al., 2002). Auch in der bereits erwähnten Studie von Pennanen und Kollegen aus dem Jahr 2004 wurden bei transgenen Tieren mit der P301L-Mutation im Alter von 6 und 11 Monaten Gedächtnisdefizite im Morris Water Maze (MWM) nachgewiesen (Pennanen et al., 2004). Es ist nicht auszuschließen, dass sich auch bei den von uns untersuchten Tieren im weiteren Verlauf und mit zunehmendem Alter der Tiere Gedächtnisdefizite im OWT gezeigt hätten. In den vorliegenden Untersuchungen konnten aber keine Gedächtnisdefizite der hWT- und der RW-transgenen Tiere im Vergleich zu WT Tieren nachgewiesen werden.

4.5 FST

Bei der Durchführung des FST wurden alle Tiere jeweils am gleichen Tag und mit der gleichen Testapparatur untersucht. Die Verhaltensweisen Struggling, Swimming und Floating wurden von zwei Kameras aufgenommen und durch die Software *Viewer II* vollautomatisch analysiert. Daher sind Fehlerquellen durch Beobachtungsfehler eines Untersuchers nahezu auszuschließen. Bei der Auswertung des FST zeigte sich für alle drei Parameter (Struggling, Swimming, Floating) ein signifikanter Effekt des Alters mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen zwischen den einzelnen Testzeitpunkten, die auch keine klare Tendenz erkennen ließen. Daher scheinen die Ergebnisse am ehesten zufällig bedingt. Allerdings konnte bei der Analyse des Floatings ab dem Zeitpunkt III für die Tiere aller Genotypen ein nahezu paralleler Anstieg des Floatings beobachtet werden. Es ist möglich, dass es sich bei diesem Verlauf um einen Alterseffekt handelte, der eine generelle Abnahme der Aktivität der Tiere mit steigendem Alter widerspiegeln könnte.

Da sich zu keinem der Testzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den hWT- und den WT-Tieren zeigte, scheint die alleinige Expression von humanem Tau-Protein keinen Einfluss auf das affektive Verhalten der Tiere zu haben. Bei den RW-Tieren allerdings zeigte sich für die Parameter Swimming und Floating ein signifikanter Effekt des Genotyps mit einem signifikant niedrigeren prozentualen Anteil des Floatings und erhöhtem prozentualen Anteil des Schwimmings an der Gesamttestzeit im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren. Für den Parameter Struggling zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Effekt des Genotyps. Der niedrigere Anteil des Floatings an der Gesamttestzeit der RW-Tiere im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren legt nahe, dass die RW-Tiere eher weniger depressives Verhalten zeigten. Die Expression von humanem RW-mutiertem Tau-Protein scheint also keinen negativen, sondern eher einen positiven Effekt auf das affektive Verhalten zu haben. Im Zusammenschau der bereits oben erwähnten Verhaltenstest (OFT, Rota-ROD) ist auch die Interpretation möglich, dass der erhöhte prozentuale Anteil des Schwimmings erneut als Ausdruck einer vermehrten motorischen Geschicklichkeit der RW-Tiere im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren anzusehen ist.

Eine Untersuchung der FST-Performance eines anderen R406W-Tau-transgenen Mausmodells im Alter von 12 bis 14 Monaten (gleiche Isoform, unterschiedlicher Promotor) zeigte im Gegensatz zu unsere Ergebnissen ein verstärktes depressives Verhalten (erhöhter Anteil des Floatings, Tab. 20) der transgenen Tiere im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontroll-Tieren (Egashira et al., 2005). Da die von uns untersuchten Tiere zu den Testzeitpunkten I bis IV deutlich jünger waren, ist hier allerdings ein Vergleich nur bedingt möglich.

4.6 SIT

Für die Durchführung des SIT wurden alle Testpaare jeweils am gleichen Tag und in der gleichen OFT-Testapparatur untersucht. Die erfassten Parameter „Anzahl der Kontakte“ zwischen den Testpartnern (RW/WT, hWT/WT) und „Kontaktzeit“ wurden über eine Kamera aufgenommen und über eine Software (Viewer II) computerbasiert analysiert. Dadurch sind auch bei diesem Test Beobachtungsfehler durch den Untersucher weitgehend ausgeschlossen. Da Haltungsbedingungen der Tiere auf den Ausgang der Untersuchung Einfluss nehmen können, versuchten wir möglichst alle Tiere in Gruppen von maximal vier Tieren pro Käfig mit genetisch identischen Geschwistertieren zu halten. Wenn es aber entweder durch spontanen Tod der Tiere oder durch die Reduktion der Gruppen für histologische Untersuchungen zu Einzelhaltung kam, führten wir keine Umsetzung zu einem neuen Käfigpartner durch. Bei diesen Tieren könnte dies möglicherweise zu einer Beeinflussung der sozialen Interaktion geführt haben (Niesink und van Ree, 1982).

Bei der Auswertung des SIT zeigte sich für die Anzahl der Kontakte ein signifikanter Effekt des Genotyps, aber nicht des Alters. Es konnte eine erhöhte Anzahl der Kontakte der Testpaare RW/WT im Vergleich zu den Testpaaren hWT/WT nachgewiesen werden. Die im Vergleich zu den Testpaaren hWT/WT erhöhte Anzahl der sozialen Kontakte der Testpaare RW/WT ist möglicherweise ebenfalls als eine Manifestation der erhöhten lokomotorischen Aktivität und Disinhibition der RW-Tiere zu interpretieren. Leider war eine Analyse der Kontaktinitiation technisch bedingt nicht möglich und ist deshalb kein Bestandteil der Computer-basierten Auswertung. Dennoch konnten wir während der Untersuchungen beobachten, dass die sozialen Kontakte der Testpaare RW/WT fast ausschließlich von den RW-Tieren initiiert wurden. Auch diese Beobachtung spricht dafür, dass die RW-Tiere eine Disinhibition aufwiesen. Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufes der Anzahl der sozialen Kontakte für die Testpaare hWT/WT und RW/WT (Abb. 33 a) zeigte, dass die Kontakte zwischen den Testpaaren RW/WT zu den Alterszeitpunkten I und II am höchsten waren und sich ab dem Zeitpunkt III an die Werte der Testpaare hWT/WT annäherten.

Für die Kontaktzeit zeigte sich sowohl ein signifikanter Effekt des Genotyps als auch des Alters, mit einer signifikant erniedrigten Kontaktzeit der Testpaare RW/WT im Vergleich zu den Testpaaren hWT/WT zu den Alterszeitpunkten III und IV. Der graphischen Darstellung (Abb. 33 c) der Kontaktzeit ist zu entnehmen, dass zu den Testzeitpunkten I und II die Kontaktzeit zwischen den Testpaaren RW/WT im Vergleich zu den Testpaaren hWT/WT tendenziell erhöht war. Im weiteren Verlauf kam es zu einer signifikant erniedrigten Kontaktzeit der Testpaare RW/WT. Dieser Effekt kann möglicherweise als Ausdruck einer zunehmenden Ablehnung und Vermeidung von sozialen Kontakten der RW-Tiere interpretiert werden, die sich erst im Verlauf des Älterwerdens der Versuchstiere manifestiert. Dieser Befund legt nahe, dass die initiale Disinhibition der RW-Tiere im zeitlichen Verlauf in eine Rückzugstendenz übergeht.

Da es bisher keine weiteren Studien des SIT bei Tau-transgenen Tiermodellen gibt, ist ein Vergleich mit anderen Untersuchungsergebnissen nicht möglich.

4.7 Zusammenfassende Beurteilung

Zu den fünf untersuchten Alterszeitpunkten konnten weder bei den RW-Tieren, noch für die hWT-Tiere mittels Rota-ROD, OFT oder FST motorische Defizite nachgewiesen werden, daher ist die Entwicklung eines *akinetisch-rigiden Parkinson Syndroms* der hWT- oder RW-Tiere während der beobachteten Alterszeitspanne nicht anzunehmen. Dennoch schließt natürlich das Fehlen von motorischen Defiziten das Vorhandensein einer Tau-Pathologie nicht aus. Es ist möglich, dass sich die Ablagerungen bei den RW-Tieren weniger oder nicht im Bereich der motorischen Systeme, sondern im Bereich nichtmotorischer Areale manifestieren. So zeigte z.B. eine Untersuchung von Lim und Kollegen für Mäuse, welche 4R-Tau mit mehreren Mutationen (R406W, P301L und G272V) überexprimierten, den Nachweis filamentöser Tau-Ablagerungen vor allem im Kortex und im Hippocampus (Lim et al., 2001). Ablagerungen im Striatum waren moderat und im Rückenmark nur schwach nachweisbar. Es konnten ebenfalls keine motorischen Defizite bei diesen untersuchten transgenen Mäusen bis zum Alter von 12 Monaten nachgewiesen werden (siehe Tab. 20). Die im Vergleich zu den hWT- und den WT-Tieren besseren Ergebnisse der RW-Tiere im Rota-ROD Test in der vorliegenden Arbeit legen erstaunlicherweise sogar eine Steigerung der motorischen Funktionalität oder eine psychomotorische Aktivierung der RW-Tiere nahe, die offensichtlich durch die Überexpression von humanem mutierten Tau-Protein verursacht wird und aus bislang ungeklärten Gründen in einem frühen Stadium des Krankheitsprozesses zu einer Verbesserung der motorischen Geschicklichkeit führt. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, zeigte eine Studie von Pennanen und Kollegen bei fünf Monate alten Mäusen, welche P301L-mutiertes Tau überexprimieren, ebenfalls deutlich bessere motorische Leistungen auf dem Rota-ROD (Pennanen et al., 2004). Auch der im FST erhöhte prozentuale Anteil des Schwimmings an der Gesamttestzeit der RW-Tiere im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren sowie die Ergebnisse des OFT (erhöhte Track-Länge, Geschwindigkeit und Aktivität) sprechen ebenfalls für eine Steigerung der motorischen Funktionalität der RW-Tiere in unseren Untersuchungen.

Bezüglich des *Affektes* konnte mittels des FST weder bei den hWT-Tieren noch bei den RW-Tieren eine Depression nachgewiesen werden. Auch die (nicht quantifizierten) vermehrten Eintritte ins Zentrum der Testarena im OFT der RW-Tiere im Vergleich zu den hWT- und den WT-Tieren sprechen dafür, dass die untersuchten Mausmodelle (RW und hWT) keine Störung des Affektes in Form einer Depression aufwiesen. Da in keiner der Untersuchungen des FST ein signifikanter Unterschied zwischen den hWT und den WT-Tieren gezeigt werden konnte, scheint die alleinige Expression von humanem Tau-Protein ohne R406W-Mutation keinen

Einfluss auf das affektive Verhalten der Tiere zu haben. Bei den RW-Tieren zeigte sich im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren sogar ein signifikant niedrigerer prozentualer Anteil des Floatings an der Gesamttestzeit. Dies legt nahe, dass die Überexpression von humanem mutierten Tau-Protein ebenfalls keinen negativen Effekt auf das affektive Verhalten der RW-Tiere ausübt.

Weiterhin konnten für beide transgenen Mausmodelle (RW und hWT) im OWT *Gedächtnisdefizite* ausgeschlossen werden, so dass angenommen werden kann, dass weder die Expression von (nicht-mutiertem) humanen Tau-Protein noch die Expression von Tau-Protein mit R406W-Mutation einen im OWT erfassbaren negativen Effekt auf die Gedächtnisleistung hat. Wie bereits im Abschnitt OWT der Diskussion erwähnt, konnten in vorangehenden Untersuchungen bei anderen Tau-transgenen Mausmodellen, z.B. bei 16 bis 23 Monate alten RW-Tieren (längste Tau-Isoform, Promotor: Alpha-Calmodulin-Kinase II) und bei P301L-Tieren (6 und 11 Monate alt) im MWM und im Angst-Konditionierungstest Gedächtnisdefizite nachgewiesen werden (Tatebayashi et al., 2002; Pennanen et al., 2004). Sowohl der Angst-Konditionierungstest als auch der MWM sind wie der von uns durchgeführte OWT an die Funktionalität des Hippocampus gebunden. Da aber unterschiedliche Gedächtnisfunktionen involviert sind, ist ein Vergleich der Test-Ergebnisse nur bedingt möglich. Mit der Durchführung der OWT wird das deklarative Gedächtnis getestet (Erinnerungen an Objekte und Gesichter) im Gegensatz dazu ist der MWM auf das spatiale Gedächtnis (Raumerinnerung) ausgerichtet (Hammond et al., 2004). Der Angst-Konditionierungstest ist zusätzlich an die Funktion der Amygdala gebunden und für das kontextuale Gedächtnis zuständig.

Bei fast allen der von uns durchgeführten Verhaltenstest konnte eine erhöhte lokomotorische Aktivität der RW-Tiere nachgewiesen werden, die sich annähernd im gesamten Zeitverlauf der Untersuchungen beobachten lässt. Die im OFT besseren Ergebnisse für alle untersuchten Parameter (Track-Länge, Geschwindigkeit und Aktivität, vermehrte Zentrumseintritte), die bessere Performance auf dem Rota-ROD, das geringere Floating und das vermehrte Swimming im FST sowie die erhöhte Anzahl der sozialen Kontakte im SIT (bei den Testdurchgängen I und II) der RW-Tiere im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren legen eine *Enthemmung (Disinhibition)* der RW-Tiere nahe. In einer vorausgehenden Studie von Tatebayashi und Kollegen (Tatebayashi et al., 2002) konnte für RW-Tiere (längste Tau-Isoform, Promotor: Alpha-Calmodulin-Kinase II) im Alter von 16 bis 23 Monaten ebenfalls eine erhöhte lokomotorische Aktivität im OFT nachgewiesen werden (Tab. 20), die sich allerdings nur in den ersten 5 Minuten des ebenfalls 30 minütigen OFT manifestierte und in der Gesamtauswertung nicht signifikant war. Histopathologisch konnten bei den untersuchten RW-Tieren Tau-Aggregationen vor allem in Hippocampus, Neokortex und Thalamus nachgewiesen werden. In Zusammenschau der Verhaltensauffälligkeiten mit nachgewiesener erhöhter lokomotorischen Aktivität und bei positivem Nachweis von histologischen Korrelaten einer Tau-Pathologie,

wurden die Verhaltensauffälligkeiten der RW-Tiere von Tatebayahi und Kollegen ebenfalls als Ausdruck einer Disinhibition der RW-Tiere gewertet. Neben der frontalen Enthemmung mit einer erhöhten Anzahl der sozialen Kontakte der RW-Tiere in den ersten beiden Testdurchgängen zeigte sich im weiteren Alterungsverlauf eine signifikante Abnahme der Kontakte im Sinne einer *sozialen Rückzugstendenz* der RW-Tiere.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in der vorliegenden Arbeit gelungen ist, FTDP-17-typische Verhaltensauffälligkeiten, insbesondere eine frontale Enthemmung (*Disinhibition*), bei den untersuchten RW-transgenen Tieren nachzuweisen. Da sich diese Verhaltensauffälligkeit zuverlässig und quantifizierbar im RW-Mausmodell reproduzieren lässt, kann dieser Verhaltensparameter im OFT, FST und SIT z.B. in zukünftigen Therapiestudien als Effektivitätsmaß benutzt werden. Eine zusammenfassende Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit demonstrierten Verhaltensauffälligkeiten im Vergleich zu den bislang in der Literatur publizierten Befunden ist in Tab. 20 dargestellt.

Tau-Isoform	Mutation	Promotor	Alter	Motorik	OFT	Gedächtnis	FST	SIT	Referenz
hTau/4R	R406W	humaner Maus- Prion-Protein-Promotor	6-58 Wo	verbesserte motorische Leistungen, keine motorischen Defizite	erhöhte lokomotorische Aktivität, vermehrt Zentrumseintritte	keine Defizite	vermindertes depressives Verhalten	Ablehnung der sozialen Kontakte	vorliegende Studie
hTau/4R	R406W	humaner Maus- Prion-Protein-Pomotor	1-18 Mo	motorische Defizite	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Zhang et al., 2004
hTau/4R	R406W	α -CaMKII- Promotor	16-23 Mo	keine motorischen Defizite, keine motorische Verbesserung	leicht erhöhte lokomotorische Aktivität	Gedächtnis-defizite	n.u.	n.u.	Tatebayashi et al., 2002
hTau/4R	R406W	α -CaMKII- Promotor	12-14 Mo	keine motorischen Defizite	n.u.	n.u.	vermehrtes Floating	n.u.	Egashira et al., 2005

Tau-Isoform	Mutation	Promotor	Alter	Motorik	OFT	Gedächtnis	FST	SIT	Referenz
hTau/4R	keine	muriner Thy1,2-Promotor	3-25 Mo	motorische Defizite bei neurogener Myopathie	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Probst et al., 2000
hTau/3R	keine	muriner Prion-Protein-Promotor	1-12 Mo	motorische Defizite	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Ishihara et al., 1999
hTau/3R	P301S	muriner Thy 1,2-Promotor	5-6 Mo	motorische Defizite bei Paraparesen	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Allen et al., 2002
hTau/4R	G272V, P301L, R406W	Maus Thy 1-Promotor	12 Mo	keine motorischen Defizite	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Lim et al., 2001
hTau/4R	P301L	Maus Thy 1-Promotor	6 Wo - 13 Mo	leichte motorische Defizite	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Terwel et al., 2005
hTau/4R	P301L	Maus Thy1,2-Promotor	5-18 Mo	verbesserte motorische Leistungen	erhöhte lokomotorische Aktivität	Gedächtnisdefizite	n.u.	n.u.	Pennanen et al., 2004

Tau-Isoform	Mutation	Promotor	Alter	Motorik	OFT	Gedächtnis	FST	SIT	Referenz
hTau/4R	P301L	Maus Thy1,2-Promotor	5-11 Mo	verbesserte motorische Leistungen	erhöhte lokomotorische Aktivität, vermehrt Zentrumseintritte	Gedächtnisdefizite	n.u.	n.u.	Pennanen et al., 2006
hTau/4R	P301L	2',3'-zyklische Nukleotid-3'-Phosphodiesterase-Promotor	12 Mo	motorische Defizite bei neurogener Myopathie	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Higuchi et al., 2005
hTau/4R	P301L	Maus-Thy 1-Promotor	8 – 10 Wo	n.u.	n.u.	verbesserte Gedächtnisleistung	n.u.	n.u.	Boekhoorn et al., 2006
hTau/4R	P301L, PS1 (M146V), APP	Maus Thy1,2-Promotor	6 Mo	n.u.	n.u.	Gedächtnisdefizite	n.u.	n.u.	Oddo et al., 2003
hTau/4R	301L	α -CaMKII-Promotor	2,5 Mo	n.u.	n.u.	Gedächtnisdefizite	n.u.	n.u.	Santacruz et al., 2005

Tau-Isoform	Mutation	Promotor	Alter	Motorik	OFT	Gedächtnis	FST	SIT	Referenz
hTau/4R	G272V und P301S	Maus Thy1,2-Promotor	3-10 Mo	keine motorischen Defizite	Hyperaktivität	Gedächtnisdefizite	n.u.	n.u.	Schindowski et al., 2006
Tau KO	keine	kein Promotor	k.A.	motorische Defizite durch Muskelschwäche	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Harada et al., 1994

Tab. 20: Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der bisher durchgeführten Verhaltensstudien Tau-transgener Tiere im Vergleich zu der vorliegenden Studie. n.u.: nicht untersucht. Mo= Monate. Wo= Wochen. k.A.: keine Angaben. hTau: humanes Tau-Protein. 4R: Tau-Protein Isoform mit vier Mikrotubuli-bindenden Aminosäuresequenzen. 3R: Tau-Protein Isoform mit drei Mikrotubuli bindenden Aminosäuresequenzen. KO: Knock out. α -CaMKII: Alpha-Calmodulin-Kinase-II. PS1: Präsenilin1-Mutation. APP: Amyloid-Precursor-Protein.

4.8 Ausblick

Die histologische Aufarbeitung der Gehirne der Tiere war kein Bestandteil dieser Arbeit und wird in einer begleitenden Promotionsarbeit der Arbeitsgruppe unternommen. Hier wird im Wesentlichen der Frage nachgegangen, in welchen Hirnarealen und in welchem zeitlichen Verlauf eine Tau-Pathologie und Nervenzellverlust auftritt, um das histopathologische Substrat der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verhaltensveränderungen zu identifizieren.

Da nur in ca. 20-30% der Fälle von FTD eine familiäre Häufung nachweisbar ist, sind die meisten Erkrankungen sporadisch und deren Ursachen möglicherweise durch Umweltfaktoren bedingt. In vorausgehenden Projekten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Molekül Annonacin aus der Frucht *Annona Muricata* als Inhibitor von Komplex I der mitochondrialen Atmungskette ein Kandidaten-Toxin für sporadische Tauopathien ist (z.B. Escobar-Khondiker et al., 2007; Lannuzel et al., 2007). In einer weiteren begleitenden Promotionsarbeit wurde an den gleichen Tiermodellen (RW, hWT und WT) unter Verwendung der gleichen Testmethoden untersucht, ob durch die chronische orale Verabreichung von Annonacin-haltigem Fruchtsaft die Verhaltensauffälligkeiten der RW-Tiere verstärkt werden. Diese Arbeit hat zum Ziel zu überprüfen, ob eine synergetische Interaktion zwischen der Überexpression von mutiertem Tau-Protein und der Wirkung von Annonacin besteht und somit Umweltfaktoren einen wichtigen Einfluss auf den Krankheitsprozess haben können.

Weitere nachfolgende Arbeiten sind in der Phase der Konzeption, bei welchen überprüft werden soll, ob durch therapeutische Interventionen (kleine anti-aggregatorische Moleküle oder Tau-siRNA) die hier beschriebenen Verhaltensauffälligkeiten normalisiert werden können.

5 Zusammenfassung

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt wurden, um die Pathogenese der neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise des Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und der Frontotemporalen Demenzen (FTD) zu verstehen, sind nach wie vor die meisten dieser Erkrankungen heute noch nicht kausal therapierbar. Die steigende Anzahl der Krankheitsfälle bei der stetig alternden Bevölkerung stellt eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem dar.

Die FTD ist eine Form der fortschreitenden Degeneration von Hirnsubstanz, die vor allem den Frontal- und Temporallappen betrifft. Im Gegensatz zur Demenz vom Alzheimer-Typ stehen klinisch nicht die Beeinträchtigung von Gedächtnisfunktionen und der Orientierung im Vordergrund, sondern vielmehr eine progrediente Veränderung der Persönlichkeit, des Antriebs und des sozialen Verhaltens der Patienten. Bilder von Antriebssteigerung bis zu einer ausgeprägten Antriebslosigkeit können vorkommen. Dies führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung der sozialen Interaktionen. Die FTD gehört - nach der Demenz vom Alzheimer-Typ und der vaskulären Demenz - zu den häufigsten Formen der Demenz. Die meisten Fälle der FTD treten sporadisch auf, in 20-30% lässt sich eine familiäre Häufung nachweisen. Die meisten dieser familiären Formen sind durch Mutationen im Tau-Gen auf Chromosom 17q21 verursacht. Sie werden daher als Frontotemporale Demenz mit Parkinson assoziiert mit Chromosom 17 (FTDP-17) bezeichnet.

Das Tau-Protein ist ein Phosphoprotein, das zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) gehört. Durch die Bindung an Tubulin ist Tau am Auf- und Abbau und bei der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt. Eine weitere physiologische Funktion ist der Transport von Proteinen und Zellorganellen. Bei der FTDP-17 liegt Tau in einer abnormen, hyperphosphorylierten und unlöslichen Form vor, akkumuliert im neuronalen Soma und verliert dadurch seine natürliche Funktion. Alle bestätigten Fälle von FTDP-17 die bis heute neuropathologisch untersucht wurden, weisen typischerweise filamentöse Aggregate auf, die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen.

Die Entwicklung von Tiermodellen, insbesondere von Mausmodellen, hilft ein besseres Verständnis der Pathogenese und der Wirksamkeit neuer Therapieansätze zu gewinnen. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Forschung durch die Verwendung von Tiermodellen erheblich profitieren kann. Der Anstoß für diese Entwicklung wurde auf dem Gebiet der FTD vor allem durch die Identifikation von Mutationen des Tau-Gens bei familiären Fällen dieser Erkrankung gegeben. Dennoch bilden die in der Forschung verwendeten Mausmodelle oft nur wenige Aspekte der betreffenden Krankheiten ab, und können nicht die Gesamtheit der klinischen Auffälligkeiten reflektieren.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war es daher zwei transgene Mausmodelle (hWT, humanes Wildtyp-Tau) und (RW, humanes Tau mit R406W-Mutation) im Vergleich zu einer nicht-transgenen Kontrollgruppe (WT, Wildtyp-Tau) mit Hilfe einer Testbatterie, bestehend aus fünf unterschiedlichen Verhaltenstests (OFT, OWT, Rota-ROD, FST, SIT), auf FTDP-17-typische Verhaltensauffälligkeiten (*Disinhibition*, *sozialer Rückzug*, *Gedächtnisdefizite*, *akinetisch-rigides Syndrom*, *Depression*) zu untersuchen.

Bei fast allen der von uns durchgeführten Verhaltenstests konnte eine erhöhte lokomotorische Aktivität der RW-Tiere nachgewiesen werden, die sich annähernd im gesamten Zeitverlauf der Untersuchungen beobachten ließ: die im OFT besseren Ergebnisse für alle untersuchten Parameter (Track-Länge, Geschwindigkeit und Aktivität, vermehrte Zentrumseintritte), die bessere Performance auf dem Rota-ROD, das geringere Floating und das vermehrte Swimming im FST sowie die erhöhte Anzahl der sozialen Kontakte im SIT (bei den Testdurchgängen I und II) der RW-Tiere im Vergleich zu den WT- und den hWT-Tieren legen eine *Enthemmung* (*Disinhibition*) der RW-Tiere nahe. Neben der frontalen Enthemmung mit einer erhöhten Anzahl der sozialen Kontakte der RW-Tiere in den ersten beiden Testdurchgängen zeigte sich im weiteren Alterungsverlauf eine signifikante Abnahme der Kontakte im Sinne einer *sozialen Rückzugstendenz* der RW-Tiere. Bezüglich des *Affektes* konnte mittels des FST weder bei den hWT-Tieren noch bei den RW-Tieren eine Depression nachgewiesen werden. Zu den fünf untersuchten Alterszeitpunkten konnten weder bei den RW-Tieren, noch für die hWT-Tiere mittels Rota-ROD, OFT oder FST motorische Defizite nachgewiesen werden, daher ist die Entwicklung eines *akinetisch-rigiden Parkinson Syndroms* nicht anzunehmen, es zeigten sich sogar deutlich bessere motorische Leistungen der RW-Tiere im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen hWT- und WT-Tiere), die erstaunlicherweise eine Steigerung der motorischen Funktionalität oder eine psychomotorische Aktivierung der RW-Tiere nahe legen, die offensichtlich durch die Überexpression von humanem mutierten Tau-Protein verursacht wird und aus bislang ungeklärten Gründen in einem frühen Stadium des Krankheitsprozesses zu einer Verbesserung der motorischen Geschicklichkeit führt. Weiterhin konnten für beide transgenen Mausmodelle (RW und hWT) im OWT *Gedächtnisdefizite* ausgeschlossen werden, so dass angenommen werden kann, dass weder die Expression von (nicht-mutiertem) humanen Tau-Protein noch die Expression von Tau-Protein mit R406W-Mutation einen im OWT erfassbaren negativen Effekt auf die Gedächtnisleistung hat. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in der vorliegenden Arbeit gelungen ist, FTDP-17-typische Verhaltensauffälligkeiten, insbesondere eine frontale Enthemmung (*Disinhibition*), bei den untersuchten RW-transgenen Tieren nachzuweisen. Da sich diese Verhaltensauffälligkeit zuverlässig und quantifizierbar im RW-Mausmodell reproduzieren lässt, kann dieser Verhaltensparameter im OFT, FST und SIT z.B. in zukünftigen Therapiestudien als Effektivitätsmaß benutzt werden.

6 Literatur

Aggleton JP. One-trial object recognition by rats. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*. 1985;37:279-294.

Allen B, Ingram E, Takao M et al. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci*. 2002;22:9340-9351.

Andreasen N, Vanmechelen E, Van de Voorde A, Davidsson P, Hesse C, Tarvonen S, R  ih   I, Sourander L, Winblad B, Blennow K. Cerebrospinal fluid tau protein as a biochemical marker for Alzheimer's disease: a community based follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64:298-305.

Arendash GW, Lewis J, Leighty RE, McGowan E, Cracchiolo JR, Hutton M, Garcia MF Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Res*. 2004;1012:29-41.

Barghorn S, Zheng-Fischhofer Q, Ackmann M, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow E Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry*. 2000;39:11714-11721.

Bathgate D, Snowden JS, Varma A et al. Behaviour in frontotemporal dementia, Alzheimer's disease and vascular dementia. *Acta Neurol Scand*. 2001;103:367-378.

Belzung C. Measuring exploratory behavior. In: Crusio W, Gerlai Re, eds. *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*. Amsterdam: Elsevier, 1999:739-749.

Binder L, Frankfurter A, Rebhun L. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol*. 1985;101:1371-1378.

Bird T, Wijsman E, Nochlin D et al. Chromosome 17 and hereditary dementia: linkage studies in three non-Alzheimer families and kindreds with late-onset FAD. *Neurology*. 1997;48:949-954.

Bird TD, Nochlin D, Poorkaj P et al. A clinical pathological comparison of three families with frontotemporal dementia and identical mutations in the tau gene (P301L). *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 (Pt 4):741-756.

Blennow K, Hampel H. CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003;2(10):605-13.

Boekhoorn K, Terwel D, Biemans B, Borghgraef P, Wiegert O, Ramakers GJ, de Vos K, Krugers H, Tomiyama T, Mori H, Joels M, van Leuven F, Lucassen PJ. Improved long-term potentiation and memory in young tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and tauopathy. *J. Neurosci*. 2006;26, 3514–3523.

Bordet T, Lesbordes J, Rouhani S et al. Protective effects of cardiotrophin-1 adenoviral gene transfer on neuromuscular degeneration in transgenic ALS mice. *Hum Mol Genet*. 2001;10:1925-1933.

Borta A, Schwarting R. Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiol Behav*. 2005;84:387-396.

Brandt R, Léger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol*. 1995;131:1327-1340.

Brion, JP, Tremp, G, Octave, JN. Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer s disease. *Am. J. Pathol*. 1999;154, 255–270.

Cools A, Gingras M. Nijmegen high and low responders to novelty: a new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;60:151-159.

Cruts M, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C. Progranulin mutations in ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Curr Alzheimer Res*. 2006;3(5):485-491.

Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J. Cell Sci.* 2001;114, 1179–1187.

de Bruin J, van Oyen H, Van de Poll N. Behavioural changes following lesions of the orbital prefrontal cortex in male rats. *Behav Brain Res.* 1983;10:209-232.

Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience and biobehavioral reviews.* 2007;31:673-704.

Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Baumann, K., Goris, J., Merlevede, W., Mandelkow, E.: Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.*, 1992;11:2131-2138.

D'Souza I, Schellenberg GD: tau exon 10 expression involves a bipartite intron 10 regulatory sequence and weak 5' and 3' splice sites. *J Biol Chem* 2002; 277: 26587–26599.

Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology.* 2000;55(11):1621-1626.

Egashira N, Tanoue A, Higashihara F et al. V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze. *Neurosci Lett.* 2004;356:195-198.

Egashira N, Iwasaki K, Takashima A et al. Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Res.* 2005;1059:7-12.

Engel T, Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3b overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but preformed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem.* 2006;99:1445-1455.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988;31:47-59.

Escobar-Khondiker M, Höllerhage M, Muriel MP, Champy P, Bach A, Depienne C, Respondek G, Yamada ES, Lannuzel A, Yagi T, Hirsch EC, Oertel WH, Jacob R, Michel PP, Ruberg M, Höglinger GU. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. *J Neurosci*. 2007;27(29):7827-37.

Feinstein SC, Wilson L. Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochimica et Biophysica Acta* 1739. 2005;268– 279.

File S. A review of 25 years of the social interaction test. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463:35-53.

File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *British journal of pharmacology*. 1978;62:19-24.

Forman MS., Lal D, Zhang B, Dabir DV, Swanson E, Lee VM, Trojanowski JQ. Transgenic mouse model of tau pathology in astrocytes leading to nervous system degeneration. *J. Neurosci*. 2005;25:3539–3550.

Foster NL, Wilhelmsen K, Sima AA et al. Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: a consensus conference. Conference Participants. *Annals of neurology*. 1997;41:706-715.

Gasparini L, Terni B, Spillantini MG. Frontotemporal dementia with tau pathology. *Neurodegener Dis*. 2007;4(2-3):236-53.

Goedert M, Wischik C, Crowther R et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:4051-4055.

Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*. 1990;9:4225-4230.

Gong CX, Iqbal K. Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem*. 2008;15(23):2321-2328.

Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.* 1995;14:1304–1313.

Götz J. Tau and transgenic animal models. *Brain research. Brain research reviews.* 2001a;35:266-286

Götz J, Tolnay M, Barmettler R, Chen F, Probst A, Nitsch RM. Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur. J. Neurosci.* 2001b;13, 2131–2140.

Greck J, Lautenschlager N, Kurz A. Clinical aspects of frontotemporal dementia. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2000;68:447-457.

Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV. Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as primary phosphate acceptor. *J.Biol. Chem.* 1994;269:4373-4380.

Grover A, England E, Baker M et al. A novel tau mutation in exon 9 (1260V) causes a four-repeat tauopathy. *Exp Neurol.* 2003;184:131-140.

Hammond RS, Tull LE, Stackman RW. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory.* 2004;82:26-34.

Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature.* 1994;369:488–491.

Hayashi S, Toyoshima Y, Hasegawa M, Umeda Y, Wakabayashi K, Tokiguchi S, Iwatsubo T, Takahashi H: Late-onset frontotemporal dementia with a novel exon 1 (Arg5His) *tau* gene mutation. *Ann Neurol* 2002; 51:525–530.

Heutink P, Stevens M, Rizzu P et al. Hereditary frontotemporal dementia is linked to chromosome 17q21-q22: a genetic and clinicopathological study of three Dutch families. *Ann Neurol.* 1997;41:150-159.

Higuchi M, Ishihara T, Zhang B, Hong M, Andreadis A, Trojanowski J, Lee VM. Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration. *Neuron*. 2002;35:433–446.

Higuchi M, Zhang B, Forman MS, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VMY. Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies. *J. Neurosci*. 2005;25:9434–9443.

Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol*. 1988;107:1449-1459.

Hodges JR, Patterson K, Ward R et al. The differentiation of semantic dementia and frontal lobe dementia (temporal and frontal variants of frontotemporal dementia) from early Alzheimer's disease: a comparative neuropsychological study. *Neuropsychology*. 1999;13:31-40.

Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee VMY. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science*. 1998;282:1914–1917.

Hosler BA, Siddique T, Sapp PC, Sailor W, Huang MC, Hossain A, Daube JR, Nance M, Fan C, Kaplan J, Hung WY, McKenna-Yasek D, Haines JL, Pericak-Vance MA, Horvitz HR, Brown RH Jr. Linkage of familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia to chromosome 9q21-q22. *JAMA*. 2000;284(13):1664-1669.

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. 1998;393:702-705.

Ingram E, Spillantini M. Tau gene mutations: dissecting the pathogenesis of FTDP-17. *Trends Mol Med*. 2002;8:555-562.

Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VMY. Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron*. 1999;24:751–762.

Ishihara T, Higuchi M, Zhang B, Yoshiyama Y, Hong M, Trojanowski JQ, Lee VMY. Attenuated neurodegenerative disease phenotype in tau transgenic mouse lacking neurofilaments. *J Neurosci*. 2001a;21:6026–6035.

Ishihara T, Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Trojanowski JQ, Lee VMY. Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol*. 2001b;158:555–562.

Ishizawa T, Sahara N, Ishiguro K, Kersh J, McGowan E, Lewis J, et al. Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* 2003;163:1057-67.

Johnson GV. Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J. Neurochem*. 1992;59:2056-2062.

JoPE RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci*. 2004;29:95-102.

Keane J, Calder AJ, Hodges JR, Young AW. Face and emotion processing in frontal variant frontotemporal dementia. *Neuropsychologia*. 2002;40:655-665.

Kertesz A, Munoz D. Pick's disease, frontotemporal dementia, and pick complex: emerging concepts. *Archives of Neurology*. 1998;55:302-304.

Kobayashi K, Kidani T, Ujike H et al. Another phenotype of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome-17 (FTDP-17) with a missense mutation of S305N closely resembling Pick's disease. *Journal of neurology*. 2003;250:990-992.

Kondo J, Honda T, Mori H et al. The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron*. 1988;1:827-834.

Kosik K, Orecchio L, Binder L et al. Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron*. 1988;1:817-825.

Kosik K, Orecchio L, Bakalis S, Neve R. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*. 1989;2:1389-1397.

Kramer JH, Jurik J, Sha SJ et al. Distinctive neuropsychological patterns in frontotemporal dementia, semantic dementia, and Alzheimer disease. *Cognitive and behavioral neurology: official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology*. 2003;16:211-218.

Lannuzel A, Höglinger GU, Verhaeghe S, Gire L, Belson S, Escobar-Khondiker M, Poullain P, Oertel WH, Hirsch EC, Dubois B, Ruberg M. Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain*. 2007;130:816-27.

Lavenex I, Pasquier F. Perception of Emotion on Faces in Frontotemporal Dementia and Alzheimer's Disease: A Longitudinal Study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2005;19:37-41.

Le Corre S, Klafki HW, Plesnila N, Hubinger G, Obermeier A, Sahagun H, Monse B, Seneci P, Lewis J, Eriksen J, Zehr C, Yue M, McGowan E, Dickson DW, Hutton M, Roder HM. An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:9673–9678.

Lee V, Goedert M, Trojanowski J. Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1121-1159.

Lendon C, Lynch T, Norton J et al. Hereditary dysphasic disinhibition dementia: a frontotemporal dementia linked to 17q21-22. *Neurology*. 1998;50:1546-1555.

Lewis J, McGowan E, Rockwood J et al. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature genetics*. 2000;25:402-405.

Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J,. FTDP- 17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol. Cell. Neurosci*. 2001;18:702–714.

Lindquist SG, Holm IE, Schwartz M et al. Alzheimer disease-like clinical phenotype in a family with FTDP-17 caused by a MAPT R406W mutation. *European Journal of Neurology*. 2008;15:377-385.

Mandelkow EM, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Van Lint J, Vendenheede JR, Mandelkow E: Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.*, 1992;314:315-321.

Mandelkow E, Schweers O, Drewes G et al. Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci.* 1996;777:96-106.

Mandelkow E, von Bergen M, Biernat J, Mandelkow EM. Structural Principles of Tau and the Paired Helical Filaments of Alzheimer's. *Disease Brain Pathol* 2007;17:83–90.

McKhann GM, Albert MS, Grossman M et al. Clinical and pathological diagnosis of frontotemporal dementia: report of the Work Group on Frontotemporal Dementia and Pick's Disease. *Archives of neurology.* 2001;58:1803-1809.

Mitchell AJ. CSF phosphorylated tau in the diagnosis and prognosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a meta-analysis of 51 studies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009; 80:966-975.

Morgan D, Munireddy S, Alamed J, DeLeon J, Diamond DM, Bickford P, Hutton M, Lewis J, McGowan E, Gordon MN. Apparent behavioral benefits of tau overexpression in P301L tau transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 2008;15:605-614.

Morris HR, Khan MN, Janssen JC et al. The genetic and pathological classification of familial frontotemporal dementia. *Archives of neurology.* 2001;58:1813-1816.

Murrell JR, Koller D, Foroud T. Familial multiple-system tauopathy with presenile dementia is localized to chromosome 17. *American journal of human genetics.* 1997;61:1131-1138.

Murrell JR, Spillantini MG, Zolo P et al. Tau gene mutation G389R causes a tauopathy with abundant pick body-like inclusions and axonal deposits. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 1999;58:1207-1226.

Muyllaert D, Terwel D, Borghgraef P, Devijver H, Dewachter I, Van Leuven F. Transgenic mouse models for Alzheimer's disease: the role of GSK-3B in combined amyloid and tau-pathology. *Rev. Neurol.* 2006;162:903–907.

Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Tagashira E. Involvement of cholinergic systems in the deficit of place learning in Morris water maze task induced by baclofen in rats. *Brain Res.*

1995;683:209-214.

Neary D, Snowden JS, Gustafson L et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology*. 1998;51:1546-1554.

Neumann M, Diekmann S, Bertsch U et al. Novel G335V mutation in the tau gene associated with early onset familial frontotemporal dementia. *Neurogenetics*. 2005;6:91-95.

Niesink R, Van Ree J. Antidepressant drugs normalize the increased social behaviour of pairs of male rats induced by short term isolation. *Neuropharmacology*. 1982;21:1343-1348.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003;39:409-421.

Ostojic J, Elfgren C, Passant U et al. The tau R406W mutation causes progressive presenile dementia with bitemporal atrophy. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2004;17:298-301

Parkinson N, Ince PG, Smith MO, Highley R, Skibinski G, Andersen PM, Morrison KE, Pall HS, Hardiman O, Collinge J, Shaw PJ, Fisher EM. MRC Proteomics in ALS Study; FReJA Consortium. ALS phenotypes with mutations in CHMP2B (charged multivesicular body protein 2B). *Neurology*. 2006;26;67:1074-1077.

Pawlak C, Schwarting R. Object preference and nicotine consumption in rats with high vs. low rearing activity in a novel open field. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;73:679-687.

Pennanen L, Wolfer DP, Nitsch RM, Götz J. Impaired spatial reference memory and increased exploratory behavior in P301L tau transgenic mice. *Genes Brain Behav*. 2006;5:369-79.

Pennanen L, Welzl H, D'Adamo P, Nitsch RM, Gotz J. Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2004;15:500 –509.

Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*. 2005;177:245-255.

Pick A. Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager Medizinische Wochenschrift*. Vol. 17, 1892:165-167.

Pickering-Brown S, Baker M, Nonaka T et al. Frontotemporal dementia with Pick-type histology associated with Q336R mutation in the tau gene. *Brain*. 2004;127:1415-1426.

Poorkaj P, Grossman M, Steinbart E et al. Frequency of tau gene mutations in familial and sporadic cases of non-Alzheimer dementia. *Archives of neurology*. 2001;58:383-387.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1977;229:327-336.

Probst A, Götz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Bürki K, Goedert M. Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol*. 2000;99:469-481.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003;463:3-33.

Rabinovici GD, Miller BL. Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs*. 2010;24(5):375-98.

Rankin KP, Kramer JH, Miller BL. Patterns of cognitive and emotional empathy in frontotemporal lobar degeneration. *Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology*. 2005;18:28-36.

Ratnavalli E, Brayne C, Dawson K, Hodges JR. The prevalence of frontotemporal dementia. *Neurology*. 2002;58:1615-1621.

Reed L, Wszolek Z, Hutton M. Phenotypic correlations in FTDP-17. *Neurobiol Aging*. 2001;22:89-107.

Rizzu P, Van Swieten JC, Joosse M, Hasegawa M, Stevens M, Tibben A, Niermeijer MF, Hillebrand M, Ravid R, Oostra BA, Goedert M, van Duijn CM, Heutink P. High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in The Netherlands. *Am J Hum Genet*. 1999;64:414-421.

Rosen HJ, Perry RJ, Murphy J et al. Emotion comprehension in the temporal variant of frontotemporal dementia. *Brain : a journal of neurology*. 2002;125:2286-2295.

Rosen HJ, Pace-Savitsky K, Perry RJ et al. Recognition of emotion in the frontal and temporal variants of frontotemporal dementia. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2004;17:277-281.

Rosso SM, Kamphorst W, de Graaf B, Willemsen R, Ravid R, Niermeijer MF, Spillantini MG, Heutink P, van Swieten JC. Familial frontotemporal dementia with ubiquitin-positive inclusions is linked to chromosome 17q21-22. *Brain*. 2001;124:1948-1957.

Rosso SM, Donker Kaat L, Baks T et al. Frontotemporal dementia in The Netherlands: patient characteristics and prevalence estimates from a population-based study. *Brain : a journal of neurology*. 2003;126:2016-2022.

Saito Y, Geyer A, Sasaki R et al. Early-onset, rapidly progressive familial tauopathy with R406W mutation. *Neurology*. 2002;58:811-813.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe H. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 2005;309:476–481.

Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Begard S, Brion JP, Hamdane M, Buee L. Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am. J. Pathol.* 2006;169:599–616.

Schwarz S, Hofmann M, Gutzen C et al. VIEWER: a program for visualising, recording, and analysing animal behaviour. *Comput Methods Programs Biomed.* 2002;67:55-66.

Sereno L, Coma M, Rodriguez M, Sanchez-Ferrer P, Sanchez MB, Gich I, et al. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol. Dis* 2009;35:359-367.

Snowden JS, Bathgate D, Varma A et al. Distinct behavioural profiles in frontotemporal dementia and semantic dementia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2001;70:323-332.

Sperfeld AD, Collatz MB, Baier H et al. FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann Neurol*. 1999;46:708-715.

Spillantini M, Bird T, Ghetti B. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol*. 1998;8:387-402.

Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT. Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am. J. Pathol*. 2006;168:1598–1607.

Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F. Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am. J. Pathol*. 1999; 155:2153–2165.

Stamelou M, de Silva R, Arias-Carrión O, Boura E, Höllerhage M, Oertel WH, Müller U, Höglinger GU. Rational therapeutic approaches to progressive supranuclear palsy. *Brain*. 2010;133(Pt 6):1578-90.

Stanford PM, Shepherd CE, Halliday GM, Brooks WS, Schofield PW, Brodaty H, Martins RN, Kwok JB, Schofield PR: Mutations in the *tau* gene that cause an increase in three repeat tau and frontotemporal dementia. *Brain* 2003;126:814–826.

Sunderland T, Linker G, Mirza N, et al.: Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *JAMA*. 2003;289:2094-2103.

Takahashi LK, Kalin NH, Ja V, Sherman JE. Corticotropin-releasing factor modulates defensive-withdrawal and exploratory behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*. 1989;103:648-654.

Talbot PR, Lloyd JJ, Snowden JS et al. A clinical role for 99mTc-HMPAO SPECT in the investigation of dementia? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1998;64:306-313.

Tanemura K, Akagi T, Murayama M et al. Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiology of disease*. 2001;8:1036-1045.

Tanemura K, Murayama M, Akagi T et al. Neurodegeneration with tau accumulation in a

transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci.* 2002;22:133-141.

Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH et al. Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:13896-13901.

Terwel D, Lasrado R, Snauwaert J, Vandeweert E, Van Haesendonck C, Borghgraef P, Van Leuven F. Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, non-lethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 2005;280:3963–3973.

The Lund and Manchester Groups. Clinical and neuropathological criteria for frontotemporal dementia. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* 1994;57:416-418.

Thiel C, Müller C, Huston J, Schwarting R. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience.* 1999;93:243-251.

Tucker KL, Meyer M, Barde YA. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat. Neurosci.* 2001;4:29–37.

Vance C, Al-Chalabi A, Ruddy D, Smith BN, Hu X, Sreedharan J, Siddique T, Schelhaas HJ, Kusters B, Troost D, Baas F, de Jong V, Shaw CE. Familial amyotrophic lateral sclerosis with frontotemporal dementia is linked to a locus on chromosome 9p13.2-21.3. *Brain.* 2006;129(Pt 4):868-876.

van Herpen E, Rosso S, Serverijnen L et al. Variable phenotypic expression and extensive tau pathology in two families with the novel tau mutation L315R. *Ann Neurol.* 2003;54:573-581.

van Swieten J, Spillantini M. Hereditary frontotemporal dementia caused by Tau gene mutations. *Brain Pathol.* 2007;17:63-73.

Varani L, Hasegawa M, Spillantini MG, Smith MJ, Murrell JR, Ghetti B, Klug A, Goedert M, Varani G: Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8229–8234.

Vogelsberg-Ragaglia V, Bruce J, Richter-Landsberg C, Zhang B, Hong M, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Distinct FTDP-17 missense mutations in tau produce tau aggregates and other pathological phenotypes in transfected CHO cells *Mol Biol Cell*. 2000;11:4093–4104.

Wang JZ, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons. *Progress in Neurobiology*. 2008; 85:148–175.

Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP, Kimonis VE. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*. 2004;36(4):377-81.

Weingarten M, Lockwood A, Hwo S, Kirschner M. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72:1858-1862.

Wijker M, Wszolek ZK, Wolters EC et al. Localization of the gene for rapidly progressive autosomal dominant parkinsonism and dementia with pallido-ponto-nigral degeneration to chromosome 17q21. *Human molecular genetics*. 1996;5:151-154.

Wilhelmsen KC, Lynch T, Pavlou E et al. Localization of disinhibition-dementia-parkinsonism-amyotrophy complex to 17q21-22. *American journal of human genetics*. 1994;55:1159-1165.

Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y et al. Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci*. 2004;24:4657-4667.

7 Abkürzungen

FTDP-17	Frontale Demenz mit Parkinson assoziiert mit Chromosom 17
FTD	Frontotemporale Demenz
RW-Tiere	Tiere, die Tau-Protein mit R406W-Mutation überexprimieren
hWT-Tiere	Tiere, die humanes Tau-Protein überexprimieren
WT-Tiere	Wildtyp-Tiere
FTLD	Frontotemporale Lobärdegeneration
PPA	Primär progrediente Aphasie
SD	Semantische Demenz
CBD	Corticobasale Degeneration
cMRT	Kranielle Magnetresonanztomographie
CCT	Kranielle Computertomographie
OFT	Offenfeldtest
FST	Forcierter Schwimm Test
SIT	Soziale Interaktionstest
ROD	Rota Rod Test
OWT	Objektwiedererkennungstest
EEG	Elektroencephalographie
SPECT	Single emission computed tomographie
PET	Positronen Emissionstomographie
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
3R-Tau	Tau-Isoform mit drei Mikrotubuli-bindenden Aminosäuresequenzen
4R-Tau	Tau-Isoform mit vier Mikrotubuli-bindenden Aminosäuresequenzen
0N-, 1N-, 2N-Tau	Entstehen durch das alternative Spleißen von Exon 2 und 3
NFT	Neurofibrillary tangles (intrazelluläre Tau-Protein Ablagerungen)
PHF	Paired helical filaments (gepaarte helicale Filamente)
SF	Straight filaments (gerade Filamente)
r/min	Runden pro Minute
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum
hWT	Humanes Wildtyp-Tau
ID	Identifikation
SEM	Standard error of mean (Standardfehler)
MWM	Morris Water Maze

8 Lebenslauf

14.11.1982	Geburt in Parchim
1989-1993	Grundschule
1993-1999	Realschule, Abschluss der Mittleren Reife
1999-2002	Gymnasium Wilnsdorf, Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife
2002-2004	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg, vorklinischer Teil
09/2004	Physikum
2004-2008	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg, klinischer Teil
2006	Beginn der Dissertation in der Experimentellen Neurologie der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg
08/2007-07/2008	Praktisches Jahr -Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, Klinik für Neurologie -Concord Repatriation General Hospital, University of Sydney, Australia, Department of Neurology -Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, Klinik für Innerer Medizin -Kantonsspital Münsterlingen, Schweiz, Chirurgische Klinik
12/2008	Abschluss des Studiums mit dem 2. Teil der Ärztlichen Prüfung
12/2008	Approbation als Ärztin
seit 04/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am UKSH, Campus Lübeck, Klinik für Neurologie

9 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg Prof. Dr. med. Günter U. Höglinger (gegenwärtige Adresse: Neurologische Klinik und Poliklinik, Technische Universität München), Dr. rer. nat. Andreas Borta (gegenwärtige Adresse: Clinical R&D CNS, Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Main) und Frau Elizabeth Yamada, PhD, MD (gegenwärtige Adresse: Abteilung für Neurologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Marburg).

10 Danksagung

Ich möchte mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. Günter Höglinger bedanken für die vertrauensvolle Annahme als Doktorandin, die fortwährende Unterstützung dieses Projektes und dafür dass er meine große Begeisterung und Faszination für die Neurologie geweckt hat.

Weiterer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Andreas Borta der mich für die Verhaltensforschung begeistern konnte und mich in meiner experimentellen Arbeit in besonderem Maße und mit viel Geduld unterstützt und gefördert hat.

Ein weiterer Dank gilt Elizabeth Yamada, die mich als weitere Betreuerin meiner experimentellen Arbeit unterstützt hat.

Ich danke meinen Eltern und Julian für die bedingungslose jahrelange emotionale und auch tatkräftige Unterstützung.

Ich danke Britta Jainsch und Robert Rottscholl durch deren Unterstützung die Arbeit zu einem tollen Projekt geworden ist und für die fachlichen und auch privaten Gespräche, die mir neue Gedanken und Lösungen aufgezeigt haben.

11 Puplicationen

Im Rahmen der Arbeit an der vorliegenden Dissertation sind folgende Veröffentlichungen entstanden bzw. in Vorbereitung:

1.1 Abstracts

Rottscholl R, Lunow M, Jainsch B, de Andrade A, Respondek G, Höllerhage M, Champy P, Oertel W.H., Yamada E, Höglinger G (2011) Gen-Umwelt Interaktion im Maus-Tauopathie-Modell. Deutscher Parkinson Kongress 2011, Kiel.

Borta, A, Yamada E, Lunow M, Jainsch B, Rottscholl R, Oertel W.H., Höglinger G (2009) Frontale Verhaltensveränderungen in R406W Tau transgenen Mäusen. Deutscher Parkinson Kongress 2009, Marburg.

Lunow M, Borta A, Yamada ES, Oertel WH, Depboylu C, Lee VMY, Höglinger G (2007) R406W-tau-transgenic mice mimic frontal behavioural alterations typical of FTDP-17. Neuroscience 2007, San Diego, California, USA.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„FTDP-17-typische frontale Verhaltensveränderungen bei R406W-Tau transgenen Mäusen“

In der Abteilung für Neurologie im medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. G.U. Höglinger mit Unterstützung durch Dr. rer.nat. A. Borta und Frau Elizabeth Yamada PhD, MD, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in dieser Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Lübeck, den 28.06.2012

